

关于水蛭透明质酸酶的研究*

杨 潼

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

关键词 水蛭,透明质酸酶,提取物

透明质酸酶 (Hyaluronidase) 这个词最初是用来命名从动物组织中得到的能水解透明质酸的酶,后来人们发现这个命名并不恰当,因为从许多动物体内得到的透明质酸酶还降解其它粘多醣,特别是软骨素或硫酸软骨素 (Meyer, 1971)。按照作用机制的不同透明质酸酶可分成三类: 1. 从哺乳动物或其它动物组织中提取的内切- β -N 乙酰氨基葡萄糖苷酶,被国际酶学会议命名为 EC 3.2.1.35; 2. 从微生物体内提取的内切己糖胺酶,被国际酶学会议命名为 EC 4.2.2.1; 3. 从医蛭 (*Hirudo medicinalis*) 头部提取物中分离出来的内切- β -葡萄糖苷酸酶,被国际酶学会议命名为 EC 3.2.1.36 (Meyer, 1971)。

Claude (1937) 首先报道医蛭提取液中有一种“扩散因子”(spreading factor), 后来 Linker 等 (1960) 证明这种扩散因子就是水蛭体内的透明质酸酶,由于能水解透明质酸的内葡萄糖醛键,因此是一种内切- β -葡萄糖苷酸酶 (endoglycuronidase)。Yuki 和 Fishman (1963) 首先纯化了这种酶,指出该酶具有的物理和化

首性质并给其活力单位下了定义。后来人们又发现它对底物表现的专一性,不降解除透明质酸以外的粘多醣,只降解透明质酸,因此与从哺乳动物和细菌中分离出来的透明质酸酶形成了明显的差异。由于对底物的专一性和独特的作用机制,引起了人们对水蛭透明质酸酶的广泛重视,由索耶(Sawyer)博士在英国威尔士创办的世界首家水蛭饲养场兼生物药物公司(BIOPHARM UK Ltd) 用医蛭分泌物生产的水蛭透明质酸酶已销往欧、美及日本并给它取了个注册商品名 Orgelase™,最近又成立了一个专门从事开发水蛭透明质酸酶商品的子公司,使之成为生产心血管药物和眼科药物及其扩散剂的中心 (Williams et al., 1990)。我国有着丰富的吸血水蛭资源可以利用,因此用吸血水蛭研制治疗脑、心血管疾病和眼科疾病的药物也是完全可能的。为了促进这一医药产品的开发,现将有关研究概述如下。

* 武汉大学生物化学专业毕业生赵祥波参加了有关的实验工作。

1 酶的性质

水蛭透明质酸酶是一种分子量为 28 500 的单体蛋白质,它专一作用于透明质酸内的葡萄糖苷酸键,产生还原端为葡萄糖醛酸的四糖残基(A-U-A-U,其中A为乙酸葡萄糖胺,U为葡萄糖醛酸)。该酶在 50℃ 以下稳定,催化作用的最适 pH 值是 5.5,最适温度是 38℃,可溶于 50% 的硫酸铵,冻干制剂能保持活力许多个月。其活性能被 $10^{-5}\text{mol/LHg}^{++}$ 完全抑制,但不被肝素抑制。酚酞葡萄糖苷酸、硫酸软骨素 B 和 C、N-乙酰(基)软骨素、硫酸类肝素、四糖化肝素、III 型多糖胶襄以及氧化淀粉对酶无影响。实验证明 10^{-3} — 10^{-4}mol/L 浓度下不能抑制水蛭透明质酸酶活性的物质有乙二胺四乙酸(EDTA)、丙酮、氯仿、硫酸镁、葡萄糖、乙醇、草酸盐、酒石酸盐等。该酶能在二乙氨乙基纤维素柱上被吸收并且能用醋酸缓冲液(pH 5.6)优先洗脱下来(Yuki et al., 1963)。

2 酶活力的定义与测定方法

对从哺乳动物来源的透明质酸酶,世界卫生组织(WHO)规定了一个通用的国际单位(IU)和具体的活力测定方法(Humphrey, 1957)。水蛭透明质酸酶的活力单位通常定义为:在 pH5.5 和 38℃ 下,每小时从透明质酸中释放 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖还原当量的还原糖所需的酶量,一个单位大约相当于 20 个国际单位,其比活力规定为每 mg 蛋白含有的单位数。Yuki 等(1963)采用新鲜欧洲医蛭(*Hirudo medicinalis*)头部匀浆液离心所获得的酶溶液 0.1ml 和透明质酸溶液 0.1ml(0.5mg)加于 0.4ml 的 0.06mol/L 柠檬酸缓冲液(pH6.0)中,用 5ml 试管加塞在 38℃ 下保温 30 分钟后迅速将管浸入沸水中 2 分钟,以终止反应。为了测量还原能力,使用了一种改良的葡萄糖半微量分析方法,用 Coleman 分光光度计在 $660\text{m}\mu$ 波长下进行测定,葡萄糖(1—5 μg)用作参考标准。Badds 等(1987)采用新鲜的以及在 -20°C 下冷冻保存的欧洲医蛭和颗粒牛蛭(*Poecilobdella granulosa*)头

部做材料,用 3,5-二硝基水杨酸比色法测量还原糖,用分析纯葡萄糖作标准曲线,用 Follin-酚试剂法测定蛋白质含量,求出酶的比活力。作者采用广泛分布在我国湖北的日本医蛭(*Hirudo nipponia*)和湖北牛蛭(*Poecilobdella hubciensis*),从活体中提取出唾液提取液并用硫酸铵进一步提纯。提纯的酶液与透明质酸在柠檬酸缓冲液中反应后,用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法进行糖的定量测定,每毫升酶液的活力单位数(μ)=标准曲线上葡萄糖微克数 $\times 10$ 。测定结果表明:1.日本医蛭唾液提取液中含酶 1200 单位/ml;比活力为 $320\mu/\text{mg}$ 蛋白。2.湖北牛蛭唾液提取液中含酶 400 单位/ml;比活力为 $200\mu/\text{mg}$ 蛋白。前人用欧洲医蛭头部提取的透明质酸酶,每条大约只能得到 230 单位的酶活力,而从日本医蛭唾液提取液中制备透明质酸酶比以上方法得率要大得多,活水蛭还可以多次重复使用,因此这是一种提取与制备透明质酸酶的好材料。

3 酶的分离与纯化

目前大多数人都采用 Yuki 等(1963)的方法来分离和纯化水蛭透明质酸酶,基本上是先匀浆水蛭的头部,加入 40% 的硫酸铵溶液,取离心后的上清液,再加入固体硫酸铵使其达到 80% 饱和度并搅拌 10 分钟,750 转/分钟离心 20 分钟分离沉淀。将以上沉淀悬浮于 70% 饱和度的硫酸铵溶液中,再经离心取沉淀并溶于 pH 7.0 的 50% 饱和度硫酸铵溶液中即得到粗制品。若要进一步提纯,可将粗制品先透析除盐,然后通过二乙氨乙基纤维素(DEAE)柱层析,便可获得较纯的制品。为了检测每步分离与纯化的效果,必须对每一步产物进行活力测定。Badds 等(1987)用欧洲医蛭和颗粒牛蛭获得了纯度为 15 000 单位的制备物。作者所在的水蛭课题组于 1993 年采用日本医蛭和湖北牛蛭的唾液提取液分别通过硫酸铵的分级沉淀、透析除盐以及二乙氨乙基纤维素(DEAE- C_{52})柱层析获得了较纯的制品,纯化后的日本医蛭透明质酸酶比活力为 $2450\mu/\text{mg}^{-1}$,湖北牛蛭为

2340 $\mu\text{g}/\text{mg}^{-1}$, 其洗脱曲线也大致相同。这个结果与 Budds 等 (1987) 的纯化结果相比, 日本医蛭略低, 湖北牛蛭的纯化结果较好。在提纯时, 始终面临着两个难题, 即是如何提高纯化的倍数和得率。据报道英国水蛭饲养场兼生物药物公司生产的水蛭透明质酸酶比活力可达 10^4 以上。尽管在二乙氨基纤维素 (DEAE-C) 柱层析后, 曾经设法使部分纯化的酶再经过 DEAE-C 或磷酸钙凝胶柱层析一次, 但是并没有提高比活力, 反而得率下降。因此, 更新提纯方法仍是解决比活力不高的唯一途径。

4 药理与应用前景

水蛭透明质酸酶强有力的抗菌性能于 1941 年为 Hirst 所证实, 在被链球菌有毒菌株腹膜感染的老鼠中, 一组用水蛭提取物进行治疗, 另一组用加热后的水蛭提取物治疗, 对照组则不接受治疗, 结果第一组的老鼠都活着, 而其它两组均死去。因为链球菌及其它细菌能产生保护它们自身免遭伤害的多糖囊, 水蛭透明质酸酶能溶解体内和体外细菌被膜并形成抗体, 从而使老鼠获得很好的药物治疗效果。唯乳动物透明质酸酶作为一种“扩散因子”长期用于促进药物传递以及麻醉剂和止痛剂的散布并被列入各国的药典。然而, 由于这种酶的固有特性以及能被肝素抑制, 使其在这类治疗中难以发挥应有的效果。对比之下, 水蛭透明质酸酶能促进药物迅速穿透皮肤并在皮内扩散, 在治疗血栓疾病时不被肝素抑制, 因而具有更大的应用价值 (Powell et al., 1989)。Bagdasarova (1969) 首先发现水蛭透明质酸酶在治疗青光眼 (白内障) 方面效果很好。由于水蛭透明质酸酶能降解在细胞间起联系作用的粘多糖-透明质酸, 如果将它和水蛭胶原酶一起使用则可以分散动物组织的细胞, 便于挑取单细胞进行分代培养或细胞克隆, 这在生物工程中特别是细胞工程中应用广泛并已成为眼科和整形医学中的有利工具。水蛭透明质酸酶不像哺乳动物透明质酸酶,

它不能降解软骨素或硫酸软骨素, 故可以在生物化学上用来原位鉴定透明质酸和研究滑液、HA-纤维蛋白以及其它含 HA 分子的细胞间基质。

我国医学蛭类种类繁多, 有着丰富的资源可加以利用。通过深入开展对水蛭透明质酸酶的基础理论和应用研究, 无疑将推动我国生物化学、药理学以及临床医学的发展, 并可望获得良好的临床治疗效果。

参 考 文 献

- 1 Budds M. J. et al. A comparison of the properties of the hyaluronidase from a temperate and a tropical species of leech. *Comp. Biochem. Physiol.* 1987, **87B**: 497—500.
- 2 Claude A. Spreading properties of leech extracts and the formation of lymph. *J. exp. Med.* 1937, **66**, 353—366.
- 3 Humphrey J. H. International standard for hyaluronidase. *Bull. WHO.* 1957, **16**:291—294.
- 4 Linker A. 1984 Hyaluronidase, Hyaluronate 4-glycanohydrolase, EC 3.2.1.35. In *The Methods of Enzymatic Analysis* (Edited by Bergmeyer H.U.), 3rd edn., Vol. 4, pp. 256—262. Academic Press, London and New York.
- 5 Linker A. et al. The production of hyaluronate oligosaccharides by leech hyaluronidase and alkali. *J. biol. Chem.* 1960, **235**: 924—927.
- 6 Meyer K. 1971 Hyaluronidases. In *The Enzymes* (Edited by Boyer P. D.), 3rd edn., Vol. 5, pp. 307—320. Academic Press, London and New York.
- 7 Powell J. C. et al. Heparin inhibits mammalian but not leech hyaluronidase. *Thromb. Res.* 1989, **55**: 791—796.
- 8 Powell J. C. et al. 1989 The spreading activity of leech hyaluronidase makes it a potential drug delivery agent. British Connective Tissue Society meeting, Cardiff, April 1989.
- 9 Sarojini S. K. and N. Gowri Presence of hyaluronic acid in the cuticle of leech *H. medicinalis*. *Indian Zool.* 1979, **3**(1—2): 95—97.
- 10 Sawyer R. T. 1986 *Leech Biology and Behaviour*, Vol 2, p.493—496. Oxford University Press.
- 11 Williams D. G. et al. 1990 Medicinal leech hyaluronidase as a potential skin penetration enhancer: in vitro permeation studies. *J. Pharm. Pharmacol.* (not detailed).
- 12 Yuki H. et al. Purification and characterization of leech hyaluronic acid endo- β -glucuronidase. *J. biol. Chem.* 1963, **238**: 1877—1879.