

· 综述与专论 ·

蚯蚓生物工程技术研究进展

广州中医药大学中药学院 (510405) 王宗伟*

河南省南阳市医药总公司 梁秀文

河南省南阳卫校 范兴亚

摘 要 从蚯蚓中已经提取出的活性成分包括: 纤溶酶、纤溶酶原激活剂、钙调素和钙调素结合蛋白、胆碱酯酶、过氧化氢酶、促髓系细胞增殖组分、抗微生物蛋白、收缩血管蛋白、溶血蛋白、免疫球蛋白样粘连物和抗肿瘤成分等。

综述近几年来国内外对上述成分的研究进展。

关键词 蚯蚓 生物工程技术 活性成分

蚯蚓又名地龙,属寡毛纲动物,在我国入药已有四千余年的历史。自 80年代初日本学者 Mihara 等从蚯蚓中提取出具有极高活性的纤溶酶以来,国内外对蚯蚓的研究空前活跃,且以纤溶酶的研究最多,取得较大进展。笔者综述近几年来国内外关于蚯蚓生物工程技术方面的研究进展

1 活性成分及生物技术研究

1.1 纤溶酶: 大量实验证明,蚯蚓提取物具有强烈的直接溶解血栓及人纤维蛋白的活性,因此蚯蚓纤溶酶的分离、纯化在蚯蚓的生物工程技术研究中占据主导地位,是该领域的研究热点。用 0.01 mol/L, pH7.8 的磷酸盐缓冲液抽提,硫酸氨盐析及 Sephadex G-75 等 3 种柱层析方法,从一种蚯蚓组织匀浆中获得一种分子量为 36 000 的丝氨酸蛋白酶类纤溶酶^[1]。从赤子爱胜蚓 *Eisnia foitida* 组织提取物中分离得到两种分子量分别为 34 000(Ⅱ)和 23 000(Ⅲ)的丝氨酸蛋白酶,Ⅱ活性高于Ⅲ,前者浓度为 10^5 ng/mL 时能使纤凝块溶解时间缩短 54%,浓度为 10^3 ng/mL 时则能完全抑制静脉血的凝固^[2]。采用加提取剂的匀浆盐析、超滤及方法,从环毛蚓 *Pheretima aspergillum* 中获得的一种单链蛋白纤溶酶,分子量为 22 000,其活性、纯度及得率均较高^[3]。另有以新鲜蚯蚓为原料,经过保温抽提、乙醇沉淀、多种层析、电泳等纯化步骤,得到一种纯度达 95% 以上的纤溶酶,分子量为 33 000,等电点为 pH3.5 该酶具有强烈的溶解纤维蛋白的作用及蛋白酶活性,平板法测得其比活性为 900 U/mg

蛋白, TAME 法测得其比活性为 25 000 U/mg 蛋白^[4]。此外,通过选择性热变性、大豆胰蛋白酶抑制剂-Sepharose 4B 亲和等层析,从蚯蚓中分离纯化得到具有强烈纤溶活性的酶组分。经 PAGE 检定为单一谱带,分子量约 32 000,属丝氨酸蛋白酶^[5]。

鉴于上述提取手段操作麻烦、流程较长,何执中等^[6]仅用提取、沉淀、凝胶分析和离子交换等方法便得到了单组分酶,收率为粗酶粉总活力的 19.1%,具有强的纤溶活性。分子量为 30 000,比活为 6 667 U/mg。此外,利用大豆胰蛋白酶抑制剂为配基的亲和层析技术,自蚯蚓匀浆液一步提取,所得纤溶酶为一组糖蛋白,1 mg 纤溶酶相当于 250~300 尿激酶单位^[7]。

为了探讨纤溶酶的适应性及扩大其使用范围,国外学者还对纤溶酶的结构进行了部分化学修饰。Nakajima 等^[8]利用人血白蛋白片段,对从蚯蚓 *Lumbricus rubellus* 中提取的 6 种蛋白酶中纤溶活性最强的一种进行了化学修饰。修饰后的酶失去了母酶的抗原性,并与人血清白蛋白片段结合形成沉淀。这种结合可以显著提高酶对大鼠血浆中蛋白酶抑制剂灭活作用的抵抗能力,且该酶不会诱导血小板凝集,能迅速溶解血栓素引起的全血血栓块。Ryu 等^[9,10]则将纤溶活性最强的蚓激酶固定于抗肿瘤药多尿烷 (polyurethane) 表面并研究其酶活性和抗栓活性,结果表明,与可溶性的蚓激酶活性相比,固定后的酶保留了 34% 的活性,且不受热灭活、降解和各种酶酸环境的影响而保持稳定,其最适 pH 值上

* Address Wang Zongwei, College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Guangzhou

王宗伟 男,1968 年出生,1990 年本科毕业于河南中医学院中药系,1998 年于广州中医药大学获得中药学硕士学位,现为该校中药学院讲师,在读博士研究生。5 年来先后在国内外学术刊物上发表论文 20 余篇,参加编写专著 3 部。目前主要从事中药新药的开发研究和中药复方抗肝纤维化的实验研究。

升了一个单位。

1.2 纤溶酶原激活剂: 蚯蚓提取物不仅具有直接溶解纤维蛋白的作用, 而且还能激活纤溶酶原, 从而间接降解纤维蛋白。北京大学学者^[11]从赤子爱胜蚓体内分离纯化出一种酶(e-PA), 纯化过程包括: 粗品的盐析、离子交换层析、凝胶过滤层析及疏水相互层析。该酶分子量为 45 000, 由 2 个亚基通过疏水相互作用维系在一起。e-PA 在纤维蛋白平板上表现出 3 种不同的纤溶活性, 分别记为: CFPg, uCFPg 和 uCF, 其中 SDS 可以增强 CFPg 活性且使 e-PA 变得对一些抑制剂更敏感, 亮肽素、抑糜素、抑肽素、抑肽酶等对 uCF 没有影响, 抑肽素能增强 CFPg 和 uCFPg 活性, 巯基抑制剂 E-64 能增强 uCFPg 和 uCF 活性。e-PA 可以切割碱性氨基酸、小的中性氨基酸及 Met 的羧基端, 同时 e-PA 确能将纤溶酶原切割为纤溶酶。这一结论提示 e-PA 可能会发展成为新型溶栓药物。e-PA 还具有降解苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE)和 N-乙酰-L-酪氨酸乙酯(ATEE)的作用, 在 8 种抑制剂中, 抑糜素和亮肽素对 e-PA 降解 BAEE 有不同程度的抑制作用; 抑肽素、E-64 和 EDTA 则对 e-PA 降解 ATEE 的活性有不同程度的抑制。

1.3 钙调素(CaM)和钙调素结合蛋白: 以赤子爱胜蚓为材料, 通过 DEAE-Fast Flow 离子交换层析、CaM-Sepharose 亲和层析, 分离纯化得到蚯蚓钙调素结合蛋白。该蛋白对 CaM 激活的环核苷酸磷酸二酯酶活性有抑制作用, 且这种抑制作用可通过加入过量的 CaM 达到完全恢复。SDS-PAGE 显示有 3 条明显主带, 用生物素-CaM 覆盖法也检测到 3 种结合蛋白, 二者结果一致。酶活性测定实验表明该蛋白有 Ca^{2+} ATPase 活性, 但无 NAD 激酶活性^[12]。此外, 从赤子爱胜蚓中还分离纯化了 CaM 和一种新的钙结合蛋白, 且两种蛋白表现均一, 分子量分别为 18 900 和 16 000^[13]。应用红外光谱技术对新钙结合蛋白二级结构的研究表明, 该蛋白中 α -helix 含量较低, 而 β -sheet 含量较高, 且随不同比例金属离子的加入, $1\ 629\ \text{cm}^{-1}$ 处 β -sheet 峰的变化较明显。初步认为其含有与 Ca^{2+} 浓度相关的特殊的结构和功能^[14]。

1.4 胆碱酯酶^[15]: 将赤子爱胜蚓的 Triton X-100 抽提液经 PEG2000 磷酸钾缓冲液处理、离子交换层析及凝胶过滤, 获得电泳纯的胆碱酯酶, 经鉴定为糖蛋白, 凝胶过滤法和 SDS-PAGE 法测得其分子量分别为 59 000 和 58 000, 其中酸性氨基酸含量约

占 24%, 碱性氨基酸含量约占 12%。热稳定性较差, 酶作用最适温度为 $39\ ^\circ\text{C}$, 最适 pH 为 7.8。 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 对酶活性的影响较小, DFP 则对该酶有强烈抑制作用。

1.5 过氧化氢酶^[16]: 将赤子爱胜蚓组织均浆抽提液经硫酸铵盐析、透析浓缩后, 用大柱制备和电泳纯化得到两个过氧化氢酶, 均为糖蛋白, 分子量分别为 390 000 和 400 000, KCN 及 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 等金属离子均抑制酶的活性, Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 则有激活作用。在直隶环毛蚓体内实验中, Zn^{2+} 显著提高过氧化氢酶的总活力; Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 先是降低, 随后提高酶总活力。

1.6 促髓系细胞增殖组分^[17]: 采用硫酸铵分段盐析、DEAE 纤维素-DE52 离子交换柱层析、Sephadex G100 凝胶过滤柱层析等方法, 从蚯蚓组织中提取有促髓系幼稚细胞增殖活性的蛋白质, 提纯倍数达 190 倍。凝胶电泳检测有 5 条区带, 蛋白酶复印结果显示其中 3 条具蛋白酶活性。该活性蛋白质有一定耐热性 ($55\ ^\circ\text{C}$, 60 min), 促增殖活性强的部分其纤溶性也强。

1.7 抗微生物蛋白: Cho 等^[18]采用肝素亲和层析和反相 C_{18} -HPLC 技术从蚯蚓 *Lumbricus rubellus* 中分离、纯化出一种新的抗微生物肽类, 命名为 lumbricin I。该成分为含脯氨酸的 62 氨基酸肽类, cDNA 序列分析证明其为一种 76 氨基酸的前体形式, 在体外实验中表现出广谱抗微生物活性而不会溶血。此外, 从 lumbricin I 的 6-34 残基分离 29 氨基酸肽还显示出比 lumbricin I 稍强的抗微生物活性。对全部 RNA 进行的 Northern 斑点分析表明, lumbricin I 基因的表达不能被细菌感染所诱导, 而且其 mRNA 表达具有特异性, 只在成年蚯蚓体内检测到, 而在幼蚓和蚓卵中均无表达。Beschin 等^[19]对赤子爱胜蚓体液中所含具有溶血作用、分子量为 42 000 的蛋白——体腔溶解细胞因子 1 (CCF-1) 进行克隆和序列分析, 表明 CCF-1 与无脊椎动物体内存在的凝集因子 G 和革兰氏阴性菌结合蛋白具有同源性, 后两者均参与无脊椎动物的防御机制。CCF-1 还能有效地结合 β -1, 3-葡聚糖和脂多糖, 并通过识别酵母菌和革兰氏阴性菌细胞壁成分而参与 prophenoloxidase 的活化。上述结果提示 CCF-1 可能在蚯蚓抗微生物方面发挥了一定的作用。

赤子爱胜蚓的体液具有抗菌、溶血和凝血等多种活性, 这些活性主要是由两种名为 fetidins 分子量约为 40 000 和 45 000 的蛋白所调节的。

Milochau 等^[20]首次采用离子交换层析技术,从蚯蚓体液中纯化了两种具有同一性的蛋白,二者均保留其原有的抗菌活性。作者还将其氨基酸序列与蚯蚓 cDNA 文库进行了对比。

1.8 收缩血管蛋白^[21]: Lyseinin 是从赤子爱胜蚓中分离的一种蛋白,具有收缩大鼠血管平滑肌的作用。日本学者利用 PCR 产生的部分 cDNA 作为探针,分离出的 cDNA 编码 lyseinin 具有 ORF 编码的 297 氨基酸残基。由 cDNA 推断的氨基酸序列与以往的血管活性物质缺乏显著的同源性。作者利用大肠杆菌重组的 lyseinin 与从蚓体分离得到的 lyseinin 对大鼠血管的收缩作用相似。对不同组织中提取的 RNA 进行 Northern 斑点分析的结果表明 lyseinin 产生于蚯蚓体细胞。

1.9 兼具溶血和凝血作用的蛋白: Eue 等^[22]采用 PAGE 法从赤子爱胜蚓体液中分离出 3 种具有溶解红细胞作用的蛋白 H1~H3,分子量分别为 46 000, 43 000 和 40 000,三者均存在不同的异构体,其中 H1 和 H2 在 SDS 中表现稳定, H3 则断裂为分子量分别为 18 000 和 21 000 的两个片段。H3 表现出溶血和凝血的双重功效,在 56℃ 时 3 种蛋白溶血活性均失去,但 H3 的凝血活性仍然稳定。此外,该种蚯蚓体液中存在的两种蛋白 fetidins 也兼具溶血和凝血的双重作用^[20]。

1.10 溶血蛋白: 赤子爱胜蚓的体液具有溶血活性, Lange 等^[23]认为是由一种分子量为 38 000 名为 eiseniapore 的溶血蛋白引起的。实验证明该成分发挥溶血作用主要是与脂膜相互作用的结果,这一过程需要鞘磷脂的参与。Yamaji 等^[24]也分离出一种新的具溶红细胞作用的蛋白,命名为 lyseinin,分子量为 41 000 将 lyseinin 与含有鞘磷脂的囊泡预培养能完全抑制其溶红细胞作用,提示 lyseinin 能与红细胞膜上的鞘磷脂特异结合,酶联免疫反应等进一步证明其能准确识别鞘磷脂的分子结构而不与鞘磷脂类似物 sphingosine ceramide 等发生反应。实验结果提示 lyseinin 可能会成为研究生物膜上鞘磷脂分子运动和功能的一种工具。

1.11 免疫球蛋白样粘连物 (adhesins)^[25]: 从赤子爱胜蚓组织匀浆的生物活性提取物 G-90 中, Popovic 等分离出具有免疫球蛋白样结构的物质 G-90/4 该物质在 ng 浓度时,刺激细胞增殖的作用即强于 G-90,且增殖活性的提高与细胞胞浆蛋白中酪氨酸水平呈正相关;在 ng 浓度时有溶细胞作用;在连接细胞的受体之间, G-90/4 发挥了粘连分子的作

用。免疫组化分析证明该结构物质存在于蚯蚓连接组织和肌肉组织中。

1.12 抗肿瘤成分: Tsunoda 等^[26]从蚯蚓中分离出一种胍类 D-lombicine,并证明其具有抑制小鼠自发性乳瘤生长的作用。构效关系研究表明,乙烯基团的存在及其长度对胍类的抗肿瘤作用具有重要意义,抗肿瘤活性的作用点位于胍乙基基团。不同给药途径对抗肿瘤作用也有影响,皮下注射时的作用强于口服给药。

2 结语和展望

蚯蚓在临床应用广泛,药理活性显著,且资源丰富,提取成本低廉,提取物毒副作用低,疗效确切。因此,蚯蚓的生物技术产品开发具有广阔的前景。笔者认为对蚯蚓的研究应注意以下问题:

2.1 加快研究步伐,缩短由理论研究向实际生产转化的时间:目前,我国开展蚯蚓生物工程技术方面研究已经有了长足进步,在纤溶酶的分离、纯化等方面取得了可喜成绩。但是在将科研成果转化为生产技术方面,效率仍然较低。因此今后应投入更多力量开展实用型蚯蚓生物工程技术研究,使科技成果早日转化为生产力。

2.2 扩大研究领域,发掘新的有效成分和新的适应症:目前国内对蚯蚓的研究多集中于纤溶活性成分,对蚯蚓常用于临床的其他疾病如肿瘤、高血压、哮喘等则少有研究,因此不利于该药的扩大使用。只有充分发挥我国临床应用经验丰富的优势,独辟蹊径,刻意创新,而不拘泥于国外的研究趋势,才能开发出在国际市场独占鳌头、真正具有国际竞争力的产品。

2.3 加强蚯蚓提取物作用机制的研究:与国外研究相比,我国开展蚯蚓药理作用机制研究步伐明显滞后于提取、分离等生物工程技术的研究进展,这种状况在一定程度上制约了蚯蚓生物工程产品的开发、应用。从国内近年报道的研究文献看,关于蚯蚓提取物溶栓等作用机制的研究不多,从分子和基因水平进行的研究更少,因而对有效成分的构效关系知之甚少。这种状况反过来也不利于有效成分的纯化,影响了产品质量的提高。因此,要提高生物工程产品的水平,必须同步开展高水平的药物作用机制的研究。

参考文献

- 1 程牛亮,等. 中国实验临床免疫学杂志, 1996, 8(2): 8
- 2 Hrzenjak T, et al. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1998, 119(4): 825
- 3 胡文军,等. 中药材, 1997, 20(2): 78
- 4 熊毅,等. 生物化学杂志, 1997, 13(3): 292
- 5 吴容,等. 生物技术, 1998, 5(2): 84
- 6 何执中,等. 中国药科大学学报, 1997, 28(6): 362

- 7 赵晓瑜,等. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(4): 407
8 Nakajima N, *et al.* Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(2): 293
9 Ryu G H, *et al.* J Biomed Mater Res, 1994, 28(9): 1069
10 Ryu G H, *et al.* J Biomed Mater Res, 1995, 29(3): 403
11 杨喜树,等. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(2): 293, 164; 14(4): 407, 417
12 王采芹,等. 北京大学学报(自然科学版), 1996, 32(2): 741
13 王立波,等. 生物物理学报, 1997, 13(2): 167
14 张燕红,等. 北京大学学报(自然科学版), 1997, 3(3): 246
15 丁诗华,等. 应用环境生物学报, 1997, 3(3): 246
16 徐炜虹,等. 华东师范大学学报(自然科学版), 1996, (4): 95
17 李俊娥,等. 中国海洋药物, 1997, 18(3): 119
18 Cho J H, *et al.* Biochim Biophys Acta, 1998, 1408(1): 67
19 Beschin A, *et al.* J Biol Chem, 1998, 273(38): 24948
20 Milochau A, *et al.* Biochim Biophys Acta, 1997, 1337(1): 123
21 Sekizawa Y, *et al.* Gene, 1997, 191(1): 97
22 Eue I, *et al.* Dev Comp Immunol, 1998, 22(1): 13
23 Lange S, *et al.* J Biol Chem, 1997, 272(33): 20884
24 Yamaji A, *et al.* J Biol Chem, 1998, 273(9): 5300
25 Popovic M, *et al.* Gen Pharmacol, 1998, 30(5): 795
26 Tsunoda S, *et al.* Anticancer Res, 1997, 17(5A): 3349
(1999-09-07收稿)

4'-去甲表鬼臼毒素衍生物 4-取代结构修饰研究进展

第一军医大学南方医院药学部(广州 510515) 许重远* 贾江滨 陈振德

摘要 在保留反式内酯环及 C-4' 游离酚羟基的基础上,对 C-4位取代氧原子或其电子等排体同系物 S N Se 的 β 构型取代基的变换修饰是国内外学者近年来主要的研究方向,显示出良好的前景。基于 DNA 拓扑异构酶结构的 4'-去甲表鬼臼毒素衍生物的设计和合成将更加有助于寻找高效、低毒的新化合物。

关键词 4'-去甲表鬼臼毒素衍生物 4-取代 结构修饰

鬼臼毒素(podophyllotoxin)是从盾叶鬼臼 *Podophyllum peltatum* 和西藏鬼臼 *P. emodi* 等植物中提取分离的一种具有抗肿瘤作用的活性成分^[1],在我国资源丰富。60年代,瑞士山道士公司先后半合成了鬼臼毒素的主体异构体 4'-去甲表鬼臼毒素(a)的 β -D-葡萄糖衍生物,即依托泊苷(Etoposide, VP16)和特尼泊苷(Teniposide, VM26),并证明是高活性的抗肿瘤药物,已相继上市^[2,3]。多年来,国内外学者对鬼臼毒素及其衍生物的结构修饰做了大量工作,合成了许多化合物并进行了活性研究。文献积累的构效关系显示,鬼臼毒素衍生物具有产生活性所必需的基本结构与活性部位: 1)分子中由 3~4 个环组成的稠环平面刚性结构,是嵌入 DNA 分子的重要功能区。2) C-4 位是一个很关键的手性部位,是母核结构上 4 个手性碳原子中唯一存在碳氧的手性碳原子,许多化学反应都易在此部位发生并影响构型,该位置碳氧为 β 构型,若为 α 构型则活性显著降低。3)反式内酯环也为抗肿瘤活性所必需,任何改变内酯环构型的新化合物皆减低或丧失抗肿瘤活性^[4]。4)E 环中的 C-4' 酚羟基若被烷基、酰基保护,活性显著下降,即使以磷酸酯基封闭也如此^[5]。只有当被封闭的 C-4' 酚羟

基能恢复,从而使它在体内容易氧化成邻醌衍生物,才有可能显示强抗肿瘤活性。国内学者用激光光解和脉冲辐射技术也证实了去甲表鬼臼毒素的活性点在 C-4 和 C-4' 位^[6]。为此,国内外研究者大多在保留 C-4 位取代的 β 构型、反式内酯环及 C-4' 位游离酚羟基的基础上,着眼于 C-4 位的氧原子上修饰或换上氧原子的电子等排体同系物 S N Se 等后再修饰。现分别介绍如下。

1 4-O-取代 4'-去甲表鬼臼毒素衍生物

1.1 侧链为糖基的衍生物: 这类化合物(图 1)以 VP16(I)、VM26(II)为代表。VP16 的合成以鬼臼毒素为原料,经溴化氢处理和水-丙酮水解获得鬼臼毒素的立体异构体(图 1-a),其 4-O-苯氧羰基衍生物与 2,3,4,6-四-O-乙酰 β -D-葡萄糖在 BE-EtO 存在下进行糖苷化,经氢解脱除苯氧羰基及乙酰基后,和乙醛形成缩醛 VP16,总产率以 a 计为 18%。若用同一保护基团保护糖的醇羟基和 4' 位酚羟基,并首先进行亚乙基反应,可显著提高总产率,以 a 计为 35%。目前国内多数生产厂家使用该路线,但 a 的选择性酰化较难控制。后来有人发现由于 C-1 上的芳环和 C1a 位联结的 γ 内酯同处一侧,占据了 α 面较大的空间,亲核试剂经位阻较小的 β 面进攻,

* Address Xu Chongyuan, Department of Pharmacy, Nanfang Hospital of the First Military Medical University, Guangzhou

许重远,男,1969年6月出生,汉族,主管药师、讲师、药学硕士。主要从事天然药物研究与开发。近年来先后承担省部级以上研究基金项目3项,获得军队科技进步三等奖1项,在核心期刊上发表学术论文20余篇。