

- 17(1): 59.
- [4] 闫家麒,童 岩,王九一. 紫杉醇脂质体的制备及其抑瘤作用的研究 [J]. 药物生物技术, 1996, 3(3): 154-157.
- [5] 赵建斌,崔 勤,王连刚,等. 补骨脂素脂质体的研制及细胞毒作用初步研究 [J]. 第四军医大学学报, 1997, 18(6): 封 3.
- [6] 高钟镐,李 虹,李晨阳. 三尖杉酯碱毫微囊的制备 [J]. 延安大学医学院学报, 1997, 20(2): 83-88.
- [7] 张志荣,路 伟. 肝靶向羟基喜树碱缓释毫微粒的研究 [J]. 药学报, 1997, 32(3): 222-227.
- [8] 杨时成,朱家璧,梁秉文,等. 喜树碱固体脂质纳米粒的研究 [J]. 药学报, 1999, 34(2): 146-150.
- [9] 潘卫三,孙稳健,胡 晋. 去甲斑蝥素毫微型胶囊制备方法的研究 [J]. 沈阳药学院学报, 1994, 11(2): 124-127.
- [10] 吴海珊,李药兰. 壳聚糖-绞股蓝总皂苷缓释微球研制 [J]. 中成药, 1997, 19(6): 1-2.
- [11] 曾凡彬,陆 彬,杨 红,等. 盐酸川芎嗪肺靶向微球的研究 [J]. 药学报, 1996, 31(2): 132-137.
- [12] 黄 园,侯世祥,杜江宇. 草乌肝靶向白蛋白微球的制剂学研究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(12): 731-733.
- [13] 邵礼铮,刘晓华,杜文清. 中药浸膏复合 $5-Fu$ 磁性微球在小鼠体内靶向定位的研究 [J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(1): 53-55.
- [14] 杨庆隆,沈耀明. 喷雾干燥法制备 藿香油等挥发油微囊的实验研究 [J]. 中成药, 1994, 16(8): 2-3.
- [15] 彭智聪,杨少芳,黄利民,等. 盐酸黄连素微囊溶出度的研究 [J]. 中国药房, 1996, 7(2): 62-63.
- [16] 谭桂山,徐平声,袁寿洪,等. 汉防己微囊中汉防己甲素的含量测定 [J]. 中国药学杂志, 1997, 32(7): 424-426.
- [17] 尹崇道. 蒿甲醚固体分散体缓释制剂的研制及其体外溶出度的观察 [J]. 中国药房, 1997, 8(6): 251-252.
- [18] 郭建平,孙其荣,周 全,等. 葛根黄酮 EC-PEG 载药系统的研究 [J]. 中国药学杂志, 1998, 33(10): 598-601.
- [19] 潘 琦,何兰茜,余勋荣. β -环糊精包结银翘解毒颗粒剂中挥发油的实验研究 [J]. 云南中医学院学报, 1999, 22(4): 1-5.
- [20] 孙敬勇,杨书斌,刘 晓,等. β -环糊精包结通宣理肺胶囊中紫苏叶挥发油的研究 [J]. 中成药, 1994, 16(10): 2-3.
- [21] 王晓平,廖工铁,侯世祥,等. β -环糊精在六神丸中的应用——两种六神丸的药剂学对比研究 [J]. 中国中药杂志, 1993, 18(7): 415-418.
- [22] 姚 波,廖工铁,郭若玲,等. 蟾酥 β -环糊精包结物制备工艺的研究 [J]. 中成药, 1989, 11(1): 4-6.
- [23] 陈路林,王洛临,林绍平. 用 N -L-OK 变性淀粉代替 β -CD 制备挥发油包合物研究 [J]. 中成药, 1999, 21(11): 555-556.

从水蛭到抗栓肽蛋白质工程—— 发展我国中药生物工程的一点思考

陈劲春,王于杰,李 军*

(北京化工大学化学工程学院 生物化工系,北京 100029)

摘 要: 目前已利用 DNA 重组技术克隆水蛭素编码基因,并通过工程菌发酵生产,仍有若干实验室通过蛋白质工程对它进行改造,由此实例引发对发展我国中药生物工程的一点思考。

关键词: 水蛭;水蛭素;抗栓肽;蛋白质工程

中图分类号: R287.74; Q819 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)02-0178-02

Protein engineering of antithrombotic hirulog from leech Thought in development of bioengineering of TCM in China

CHEN Jin-chun, WANG Yu-jie, LI Jun

(Department of Biological and Chemical Engineering, College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Engineering, Beijing 100029, China)

Key words leech; hirudin; hirulog; protein engineering

水蛭是一种生长在沼泽、湖泊及水田里的软体动物,属蚂蝗科,拉丁学名为 *Hirude nipponica* Whitman. 入药者乃是日本医蛭、宽体金线蛭及茶色蛭总称。目前重组水蛭素已在瑞士、日本获准上市,我国也在审批之中。为了使它成为更强的抗栓药,仍有一些实验室正在应用蛋白质工程对其进行改造。我们回顾这一抗栓药物的研究简史,或许对发展我国生物技术有所借鉴和裨益。

1 水蛭素抗血拴分子药理

1884年 Haycraft 首先发现新鲜医用水蛭 *Hirude medicinalis* 提取物含抗凝血物质,但直至 1955年 Markwardt 等从医用水蛭中才分离出水蛭素(hirudin, HV),共有 7种异构体。1984年 Dodt 首先测出其一级结构,确认 HV 是一条含 65个左右氨基酸的多肽^[1]。根据提取的体位不同, HV 有几种形式: 1)从口部提取的具有高活性的 HV-2,其 N

* 收稿日期: 2000-06-12; 修回日期: 2000-07-10

作者简介: 陈劲春(1947-),男,教授,理学博士,从事基因工程方面教学与科研工作。

Tel (010) 64445601 E-mail hongkm@ihw.com.cn

末端是 Ile,全长 65个氨基酸;2)从头部提取的 HV-1,其活性仅为口部的 22%,N 端是 ValVal,与 HV-2差 9个氨基酸;3)从身体其他部位提取的 HV-3,其活性近乎于零。

HV 通过和凝血酶直接结合而发挥抗凝血作用^[2]。凝血酶是血液凝固、止血过程和血栓形成的中心酶之一。它专一性地水解纤维蛋白原上的 Arg-Gly 键,使之转变成纤维蛋白;纤维蛋白相互作用会进一步形成血栓。凝血酶由 A、B 两条链构成,有几个结构域:(1)活性部位位于 B 链 Ser-195;(2)位于活性部位附近的底物结合槽;(3)由碱性氨基酸组成的纤维蛋白原识别部位,又称阴离子结合外部位(anion-binding exosite, ABE)。

HV 的 2 个结构域通过不同的机制分别和凝血酶相互作用,抑制其活性。其 C 端长链通过和凝血酶的纤维蛋白原识别部位结合,拮抗凝血酶对纤维蛋白原的识别。凝血酶 B 链中的 7 个 Lys 残基参与此影响,彼此间通过离子作用和疏水作用相互作用,而 HV 的 N 末端核心结构域通过和凝血酶的活性部位结合而抑制它的催化活性。实验还表明, HV 同凝血酶活性部位和结合部位的结合具有协同性^[3-5]。

临床实验结果也表明, HV 的抗栓作用不需要其它因子的作用;又不会引起出血等副作用。其效果超过小分子肝素。因此被认为是 2010 年前最强的可逆性凝血酶直接抑制剂。全球约有 20 亿美元市场销售量^[6]。

2 水蛭肽蛋白质工程

由于天然 HV 的药用价值及来源稀少,欧美日等国的科研人员相继采用 DNA 重组技术研制抗栓药 HV。1986 年 Harrey 等通过构建相关 cDNA 文库,应用一个 48 bp 控针克隆了其编码基因,以 pTg927 为载体,λ PL 为启动子,在宿主大肠杆菌中表达有活性的水蛭素。此后, Fortkamp 小组等对水蛭素的表达及结构改造都做了许多工作。值得指出的是, Maraganore 等人工合成了对凝血酶有专一性抑制作用的水蛭肽(hirulog),活性比 HV 高 2 倍。国内也有几个研究小组采用化学合成基因定点突变改造水蛭肽^[7,8]。显然对 HV 的结构改造有可能产生更好的抗栓药。

另一方面,天然 HV Tyr-63 连接 -SO₃H 基团,而迄今为止,重组 HV Tyr-63 缺少磺基。这个变化对其稳定性甚至活性有一定影响,因此进一步改造重组 HV 仍有必要。

3 应用 DNA 重组技术挖掘传统中医药宝库

(上接第 170 页)

药学研究未见报道。本文对兰州肉苁蓉的药材性状,显微特征进行了描述,并绘制了横切面简图,列出了肉苁蓉属 5 种植物的性状检索表。

5.2 本研究表明:兰州肉苁蓉与肉苁蓉有相同的成分,但又有一定差异;兰州肉苁蓉是否可替代肉苁蓉,有待于进一步研究。

从水蛭到重组抗栓肽蛋白质工程,可以说明将现代一些科研手段、实验技术和直观思维方式等引入传统中医药研究中,无疑会带来一些好处。

3.1 从分子水平阐明了中草药药效的物质基础,这对于中草药走向国门,尤其被“西洋人”接受大有益处。

3.2 对于一些来源稀少的药用多肽,采用 DNA 重组技术,既可以满足社会需求,又可以做到价廉物美。

3.3 有利于保护自然资源。羚羊角单味(有效成分可能是角蛋白)可退高热,麝香中一个小肽抗炎能力是氢化可的松的 36 倍,但羚羊、麝都属于保护动物。若采用 DNA 重组技术生产其中的药用蛋白则可以保护这些野生动物。

3.4 使传统中医药研究进入新时代。传统中医药学是中华民族优秀文化的重要组成部分,历史悠久,博大精深。尽管中医药讲究整体、注重平衡,复方成分复杂,但它的精髓很可能是 21 世纪医药研究的热点之一。对此,我们理应给予更多的关注。尤其是那些有明确疗效的多肽或蛋白的创新研究,应当得到社会或政府的有力支持。

近年来,我国不少省市把发展医药产业作为经济增长点并取得了一定成效。有理由相信应用 DNA 重组技术挖掘传统中医药宝库,未来 5~10 年内会有若干个国家一类新药问世,显然这是我国发展生物技术产业的重要课题之一。

参考文献:

- [1] 刘钢,丁振刚.新的抗凝药物——水蛭肽的研究进展[J].国外医学·药学分册,1995,22(3):133-138.
- [2] 李秀珍.开发中的抗栓剂——水蛭素及其 12 肽[J].军事医学科学院院刊,1996,20(1):73-75.
- [3] Chang Jui-Yoa. The functional domain of hirudin, a thrombin-specific inhibitor [J]. FEBS, 1983, 164(2): 307-313.
- [4] Maraganore J.M., Blourdon P., Jabousk J, et al. Design and characterization of hirulogs: A novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin [J]. Biochemistry, 1990, 29(30): 7095-7101.
- [5] Timothy J. Rydei G., Ravichandran A, et al. The structure of a complex of recombinant hirudin and human α-thrombin [J]. Science, 1990, 249: 277-280.
- [6] 邹和昌.溶栓剂的发展及研究[J].中国药学杂志,1997,32(5):263-267.
- [7] 鹿峪峰,王朝晖,韩玉珉.重组水蛭素的突变及突变部分性质研究[J].中国生物化学与分子生物学报,1998,14(1):32-37.
- [8] 谭树华,吴梧桐,刘景晶.新型大肠杆菌融合表达水蛭素 III 基因研究[J].中国生化药物杂志,1992,20(1):10-12.

致谢:甘肃省药品检验所朱俊如副主任药师给予帮助。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].69卷.北京:科学出版社,1990.
- [2] 何燕萍,尹哲洙,屠鹏飞,等.肉苁蓉生药鉴定与商品调查[J].中药材,1997,20(3):117-121.