

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202306013



双功能型纤溶酶的研究进展

严慧, 周晶晶, 林宏峻, 唐明青

(华侨大学 医学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 综述双功能型纤溶酶(dFE)的物种来源,介绍双功能型纤溶酶的纯化工艺和酶活特性,为其进一步开发提供参考.结果表明:双功能型纤溶酶是一种同时具有纤溶酶原激活功能和纤维蛋白直接降解功能的新型纤溶物质,其来源广泛,多为微生物来源;分离纯化工艺繁琐,以多层色谱为主;大多体现丝氨酸蛋白酶活性特征,受金属离子、pH值和蛋白酶抑制剂影响较大.

关键词: 纤溶酶原; 纤维蛋白; 纤溶酶; 纤溶; 血栓

中图分类号: Q 71

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2023)04-0427-08

Research Progress of Dual-Functional Fibrinolytic Enzyme

YAN Hui, ZHOU Jingjing, LIN Hongjun, TANG Mingqing

(School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The species origin of dual-functional fibrinolytic enzyme (dFE) was reviewed, and the purification processes and enzyme activity characteristics of dFE were introduced to provide reference for its further development. The results showed that dFE was a novel fibrinolytic agent with both the functions of plasminogen activation and direct fibrinolysis. It had a wide range of sources, mostly microorganisms sources. The separation and purification processes were complicated, mainly based on multi-layer chromatography. It mostly exhibited the enzymatic characteristics of serine proteinase, and was greatly affected by metal ions, pH value and protease inhibitors.

Keywords: plasminogen; fibrin; fibrinolytic enzyme; fibrinolysis; thrombosis

血栓性疾病严重威胁着人类的生命健康,其发病率高居各种疾病之首,且近年来还有渐增之势,是当代医学研究的重点和热点之一^[1].目前,用于临床溶栓治疗的溶栓制剂按其作用机制可以分为纤溶酶原激活剂(PA)和纤维蛋白溶解剂两大类.纤溶酶原激活剂主要将体内的纤溶酶原激活成活性的纤溶酶,再发挥溶栓效应,如组织型纤溶酶原激活剂(tPA)、尿激酶(UK)、链激酶(SK)等^[2-4].纤维蛋白溶解剂则能够直接降解纤维蛋白,溶解血栓,如各种蛇毒金属蛋白酶(SVMP)和纤溶酶^[5].不同的溶栓分子机制决定了两类溶栓制剂的优缺点,如纤溶酶原激活剂具有较好的靶向性和安全性,但溶栓效果却严重依赖于患者自身的纤溶酶原水平;纤维蛋白溶解剂能独立快速溶解血栓,但却容易被血清中的各种抑制剂抑制,靶向性也较差^[6-7].

双功能型纤溶酶(dual-functional fibrinolytic enzyme, dFE)是一种新型纤溶物质,同时具有纤溶酶原激活效应和纤维蛋白直接溶解效应.由于双功能型纤溶酶能够很好地弥补现有纤溶药物的不足.鉴于此,本文对双功能型纤溶酶的物种来源、纯化工艺及酶活特性进行较为全面的综述.

收稿日期: 2023-06-15

通信作者: 唐明青(1982-),男,副教授,博士,主要从事血栓纤溶系统及基因治疗的研究. E-mail: Tmq@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省科技计划项目(2019J01070);福建省泉州市科技计划项目(2018Z012);福建省厦门市科技计划项目(3502Z20227197);福建省中青年教育科研项目(JA14020);华侨大学人才引进项目(14BS111)

1 双功能型纤溶酶的物种来源

作为中国传统中药,地龙(earthworm)又称蚯蚓、土龙等,是目前已知最早的具有医书记载的抗血栓药材之一.最新版《中国药典》中明确显示地龙具有通络功效,可用于治疗中风半身不遂^[8],这正是地龙抗栓溶栓的最直接体现.目前,已有多种以地龙为主药的复方或中成药用于血栓的临床治疗,如各种(复方)地龙(溶栓)胶囊^[9-10].虽然地龙的抗栓溶栓功效已得到广泛的印证,但具体效应物质却尚未明确.直到1991年,Hisashi等^[11]才从粉正蚓(*Lumbricus rubellus*)中分离得到一种同时在含纤溶酶原的纤维平板和不含纤溶酶原的纤维平板中显示纤溶效应的物质.进一步的划段纯化表明,这类物质是由类糜蛋白酶(chymotrypsin-like enzyme)、类胰蛋白酶(trypsin-like enzyme)和未知类型蛋白酶组成的混合物,并将此类混合物命名为蚓激酶(lumbrokinase).除粉正蚓外,后续研究表明,不同的蚯蚓品系均存在此类双功能型纤溶酶,但不同品系之间的酶的氨基酸组成、分子质量和酶活特性存在明显差异^[12-14].

方格星虫(*Sipunculus nudus*),又名土笋、沙虫、海蚯蚓,是闽南名小吃“土笋冻”中的主要原材料.除形态结构的高度相似性外,星虫与蚯蚓在分类学中也具有高度的相似性,同属于螺旋卵裂动物(*Spiralia*)、冠轮动物总门(*Lophotrochozoa*)、环节动物门(*Annelida*).目前,课题组已在方格星虫中分离鉴定出多种双功能型纤溶酶(申请号/专利号:202310108470.9).通过多层色谱、亲和纯化和蛋白结晶,课题组首次获得2个方格星虫纤溶酶(SFE)的蛋白晶体(PDB:8HZO,8HZP),通过晶体结构分析,获得SFE的关键三联体催化位点信息,同时完成了首个方格星虫的全基因组测序(CNGB:CNP0003708),成功预测出17个纤溶酶基因.除方格星虫外,在可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)中也发现了大量的双功能型纤溶酶,但其含量比方格星虫略低.

目前,在微生物、藻类、蛭类、昆虫、蘑菇和植物中都已经分离出大量的双功能型纤溶酶.其中,微生物来源占据了绝大部分,这可能与微生物特殊代谢通路有关,也可能与庞大的微生物种群有关.在这些已报道的微生物中,又以细菌尤其是杆菌(*Bacillus*)为主.微生物来源的双功能型纤溶酶,如表1所示.

表 1 微生物来源的双功能型纤溶酶
Tab.1 Microbiological sources of dFE

| 来源 | 微生物种类 | 酶名称 | 参考文献 |
|-------|---|-----------------|--------|
| 豆豉 | <i>Bacillus subtilis</i> | Nattok B-12 | 文献[15] |
| 豆豉 | <i>Bacillus subtilis</i> DC27 | DEF27 | 文献[16] |
| 农业废弃物 | <i>Bacillus halodurans</i> | IND18 | 文献[17] |
| 海绵 | <i>Aspergillus versicolor</i> | ZHL-1 | 文献[18] |
| 蛹虫草 | <i>Cordyceps militaris</i> | — | 文献[19] |
| 豆豉 | <i>Bacillus subtilis</i> DC33 | Subtilisin FS33 | 文献[19] |
| 茶树菇 | <i>Agrocybe aegerita</i> | — | 文献[20] |
| 长春花 | <i>Xylaria curta</i> | Xylarinase | 文献[19] |
| 食用菌 | <i>Pleurotus ferulae</i> | — | 文献[21] |
| 印尼豆豉 | <i>Bacillus subtilis</i> TP-6 | TPase | 文献[19] |
| 平菇 | <i>Pleurotus ostreatus</i> | — | 文献[19] |
| 猴头菇 | <i>Hericium erinaceum</i> | Herinase | 文献[22] |
| 虾酱 | <i>Bacillus</i> sp. nov. SK006 | — | 文献[23] |
| 豆豉 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JXNUWX-1 | — | 文献[19] |
| 豆豉 | <i>Bacillus subtilis</i> LD-8547 | DFE | 文献[24] |
| 韩国豆酱 | <i>Bacillus</i> sp. CK 11-4 | CK | 文献[25] |
| 北海湾淤泥 | <i>Bacillus subtilis</i> HQS-3 | — | 文献[26] |
| 发酵豆制品 | <i>Bacillus cereus</i> FF01 | Bacethrombase | 文献[27] |
| 土壤 | <i>Bacillus</i> sp. AS-S20-I | Bafibrinase | 文献[19] |
| 河岸土壤 | <i>Bacillus velezensis</i> Z01 | Velefibrinas | 文献[28] |
| 大曲 | <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i> | — | 文献[29] |
| 真菌 | <i>Sarocladium strictum</i> | Proteinase III | 文献[30] |

2 双功能型纤溶酶的分离纯化

与传统天然蛋白的分离纯化相似,天然双功能型纤溶酶的纯化也主要根据蛋白的极性、电荷、溶解性、分子质量、等电点等特性进行分离纯化,都需要经过原液制备、蛋白粗制、蛋白精制、产品鉴定 4 个阶段. 双功能型纤溶酶的纯化工艺,如表 2 所示. 表 2 中: z 为产品活性.

表 2 双功能型纤溶酶的纯化工艺
Tab. 2 Purification processes of dFE

| 来源 | 酶名称 | 精制方法 | $z/\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ | 参考文献 |
|--|------------------------|--|--------------------------------------|--------|
| <i>Pheretima vulgaris</i> | EPF3 | 硫酸铵沉淀、HiTrap Q HP 柱层析、Superdex G-75 柱层析 | 3 060.20±66.18 | 文献[12] |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Natto B-12 | 硫酸铵沉淀、Sphadex G-75 柱层析、Phenyl Sepharose HP 柱层析 | 88 623.72 | 文献[15] |
| <i>Bacillus subtilis</i> DC27 | DEF27 | UnoQ Sepharose 柱层析、Sephadex G-75 柱层析、高效液相色谱 | 187 944.25 | 文献[16] |
| <i>Bacillus halodurans</i> | IND18 | 硫酸铵沉淀、DEAE-cellulose 阳离子色谱、Casein-agarose 亲和层析 | 21 254.25 | 文献[17] |
| <i>Aspergillus versicolor</i> | ZHL-1 | 硫酸铵沉淀、阳离子交换色谱 | 65 111.35 | 文献[18] |
| <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> | — | 硫酸铵沉淀、透析、高效液相色谱 | 17 220.11 | 文献[19] |
| <i>Cordyceps militaris</i> | — | 硫酸铵沉淀、Phenyl-Sepharose HP 柱层析、CM-Sepharose FF 柱层析、Superdex 75 柱层析 | 1 467.4 | 文献[19] |
| <i>Bacillus subtilis</i> DC33 | <i>Subtilisin</i> FS33 | 硫酸铵沉淀、Phenyl Sepharose 6FF 柱层析、DEAE-Sepharose FF 柱层析、Sephadex G50 凝胶色谱 | 24 461.56 | 文献[19] |
| fruiting bodies of mushroom <i>Agrocybe aegerita</i> | — | 硫酸铵沉淀、CM-Sepharose Fast Flow 色谱、Source 15PHE 疏水层析、Mono S5/50 强阳离子色谱 | 28 618.56 | 文献[20] |
| <i>Xylaria curta</i> | <i>Xylarinase</i> | 硫酸铵沉淀、透析、超滤、Sephacryl S-300 柱层析 | 153.70 | 文献[19] |
| <i>Pleurotus ferulae</i> | — | 乙醇沉淀、CM-cellulose 柱层析、DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析、Sepharose G-25 柱层析、HiPrep 26/10 柱层析 | 20 893.01 | 文献[21] |
| <i>Bacillus velezensis</i> Z01 | <i>Velefibrinas</i> | 乙醇沉淀、t-Butyl HIC 柱层析、DEAE-Sephadex 柱层析 | 1 274.59 | 文献[28] |
| <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i> | — | 硫酸铵沉淀、透析、DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析、Sephadex G-75 凝胶色谱 | 27 425.48 | 文献[29] |
| <i>Lumbricus rubellus</i> | <i>Lumbrukinase</i> | 硫酸铵沉淀、Sephadex G-200 柱层析、DEAE-cellulose 柱层析、Sephadex G-75 柱层析、Toyopearl HW-55 柱层析 | — | 文献[11] |

蛋白粗制主要实现将原液中的蛋白进行初步的浓缩,同时去除部分溶解性差的或者分子结构差异巨大的蛋白类、脂质、糖类及小分子. 目前,最常用的是采用饱和硫酸铵沉淀或乙醇沉淀或丙酮沉淀,再经过透析或挥发去除残余沉淀剂. 如果知道目的蛋白的等电点的话,可以进一步结合等电点沉淀,进一步提高沉淀效率和纯度. 以 SFE 为例,课题组在进行 SFE 粗制时发现,硫酸铵对 SFE 的沉淀效率比乙醇高,而且沉淀物极易溶于缓冲液,而乙醇沉淀物不易溶于缓冲液,纤溶酶活性损失大,而且体积分数为 20% 的饱和硫酸铵初级沉淀能有效去除大量的杂蛋白. 因此,在实际操作中,根据目标 SFE 蛋白的等电点为 4,建立 SFE 粗制工艺:体积分数为 20% 的饱和硫酸铵沉淀 8 h(pH=7),10 000g×30 min 离心取上清,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,体积分数为 70% 的饱和硫酸铵沉淀 3 h(pH=4),10 000g×30 min 离心去上清,PBS 重悬,10 000g×30 min 离心取上清.

蛋白精制过程主要是利用目标蛋白与其他杂蛋白的疏水性、亲水性、分子质量、亲和性、分子间作用力等差异性特征进一步去除杂蛋白,这也是双功能型纤溶酶纯化过程中最为关键和复杂的一个环节.目前,已报到的双功能型纤溶酶精制工艺基本都是多重色谱纯化技术,即综合使用阳离子色谱、阴离子色谱、凝胶色谱、亲和色谱、分子筛和高效液相色谱等柱层析工艺进行分离纯化.以 SFE 为例,课题组在进行 SFE 精制过程中则逐步采用了 Sephadex G-25 柱层析、DEAE-Sephrose Fast Flow 柱层析、Superdex 75 柱层析和 Resource Q 柱层析进行目标蛋白的分离纯化,最终获得质量分数为 95% 的高纯度 SFE,为接下来的蛋白结晶奠定了基础.同时,为了简化蛋白精制工艺,课题组还根据所得的 SFE 蛋白晶体结构(PDB:8HZO,8HZZ)开发了首个 SFE 的亲和纯化工艺.将原来的多重色谱精制工艺简化成 Lysine-Sephrose 4B 和 Arginine-Sephrose 4B 的一步亲和纯化法(申请号/专利号:202310108470.9),大大简化了蛋白精制过程,降低制备成本.

最后的产品鉴定主要完成对纯化所得蛋白的纯度及活性鉴定.纯度鉴定主要通过 SDS-PAGE,Native-PAGE 和高效液相等手段完成.活性鉴定则包括纤溶酶原激活酶活性鉴定和纤维蛋白降解活性鉴定两个层面.由于目前市售的纤维蛋白原普遍含有微量的纤溶酶原污染,因此,常规的做法是通过加热纤维平板来降低潜在的纤溶酶原影响,如采用加热平板来测定目标蛋白的纤维蛋白降解活性,再通过比较非加热平板和加热平板之间的纤溶圈大小来判断是否具有纤溶酶原激活活性.但加热却会使纤维蛋白变性,导致两者之间的纤维蛋白不处于同一状态,降低比较的准确性.课题组在进行 SFE 活性鉴定时则采用了完全无纤溶酶原的纤维蛋白原进行纤维平板制备,从根源上解除了加热平板的潜在问题.同时,采用目标蛋白与纤溶酶原先孵育 1 h(37 ℃),采用 Native-PAGE 分离反应物,再用无纤溶酶原的纤维蛋白平板原位埋胶法直接测定 SFE 的纤溶酶原激活酶活性及所激活产生的效应片段大小.

3 双功能型纤溶酶的酶活特性

通过系统比较已知双功能型纤溶酶的酶学活性类型、分子质量、最适温度与最适 pH 值、激活剂与抑制剂、对底物的选择性等基本生化特征.双功能型纤溶酶的酶活特性,如表 3 所示.表 3 中:PMSF 为苯甲基磺酰氟;EDTA 为乙二胺四乙酸;EGTA 为乙二醇四乙酸;CTAB 为十六烷基三甲基溴化铵;SBTI 为大豆胰蛋白酶抑制剂;APMSF 为 4-脒苯基-甲磺酰氟盐酸盐;PCMB 为对氯汞苯甲酸酯;DTT 为二巯苏糖醇;IAA 为吡啶-3-乙酸;TPCK 为甲苯磺酰-苯丙氨酸氯甲基酮.

表 3 双功能型纤溶酶的酶活特性
Tab.3 Enzymatic features of dFE

| 来源 | 酶名称 | 分子质量/ku | 最适 pH 值 | 最适温度/℃ | 金属离子激活剂 | 抑制剂 | 酶活类型 | 参考文献 |
|-----------------------------------|------------------------|------------|---------------|--------|---|--|-----------|--------|
| <i>Serratia marcescens</i> subsp. | <i>Sakuensis</i> | 43.0 | 7.0 | 55 | Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , DTT | PMSF, EDTA, Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Li ²⁺ , Ca ²⁺ | 丝氨酸-金属蛋白酶 | 文献[19] |
| <i>Aspergillus versicolor</i> | ZHL-1 | 37.3 | 5.0 | 40 | SDS | EGTA, EDTA, CTAB | 金属蛋白酶 | 文献[18] |
| <i>Cordyceps militaris</i> | — | 24.5, 28.0 | 7.2 | 37 | Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Fe ³⁺ , Fe ²⁺ | SBTI | 丝氨酸蛋白酶 | 文献[19] |
| <i>Bacillus subtilis</i> DC33 | <i>Subtilisin</i> FS33 | 30.0 | 8.0 | 55 | — | PMSF, SBTI, 肽抑素 A, Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Sn ²⁺ , Ag ⁺ , Ti ²⁺ | 丝氨酸蛋白酶 | 文献[19] |
| <i>Agroclybe aegerita</i> | — | 31.4, 21.2 | 7.6 | 47 | Cu ²⁺ , Na ⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺ , Ba ²⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺ | Fe ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , PMSF, SBTI | 丝氨酸蛋白酶 | 文献[20] |
| <i>Xylaria curta</i> | <i>Xylarinase</i> | 33.0 | 8.0 | 35 | Ca ²⁺ | Fe ²⁺ , Zn ²⁺ EDTA, EGTA | 金属蛋白酶 | 文献[19] |
| <i>Pleurotus ferulae</i> | — | 20.0 | 4.0, 5.0, 8.0 | 50 | — | Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , EGTA, EDTA | 金属蛋白酶 | 文献[21] |

| 续表 Continue table | | | | | | | | |
|---|----------------|------------|---------|--------|--|---|-----------|---------|
| 来源 | 酶名称 | 分子质量/ku | 最适 pH 值 | 最适温度/℃ | 金属离子激活剂 | 抑制剂 | 酶活类型 | 参考文献 |
| <i>Bacillus subtilis</i> TP-6 | Tpase | 27.5 | 7.0 | 33 | Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | PMSF, EDTA, β-巯基乙醇 | 丝氨酸蛋白酶 | 文献 [19] |
| <i>Asterina pectinifera</i> | Starase | 48.0 | 8.0 | 50 | — | PMSF, APMSF | 丝氨酸蛋白酶 | 文献 [31] |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | — | 13.6, 18.2 | 7.4 | 45 | Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ | EDTA | 金属蛋白酶 | 文献 [19] |
| <i>Hericium erinaceum</i> | Herinase | 51.0 | 7.0 | 30 | Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ | Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , EDTA, EGTA | 金属蛋白酶 | 文献 [22] |
| <i>Bacillus</i> sp. nov. SK006 | — | 43~46 | 7.2 | 30 | — | PMSF, EDTA, PCMB, Cu ²⁺ , Ca ²⁺ , Fe ³⁺ , Hg ²⁺ | 丝氨酸蛋白酶 | 文献 [23] |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Jxnuwx-1 | — | 29.0 | 7.6 | 41 | — | PMSF, SBTI, EDTA, Fe ³⁺ , Fe ²⁺ | 丝氨酸蛋白酶 | 文献 [19] |
| <i>Bacillus subtilis</i> LD-8547 | DfE | 30.0 | 8.0 | 40 | Al ³⁺ , Zn ²⁺ | PMSF, 亮氨酸, β-巯基乙醇, DTT, Mn ²⁺ , Ba ²⁺ | 丝氨酸蛋白酶 | 文献 [24] |
| <i>Bacillus</i> sp. CK 11-4 | CK | 28.2 | 10.5 | 70 | — | PMSF, EDTA, 6-氨基己酸, E64, 肽抑素 A | 枯草杆菌素样蛋白酶 | 文献 [25] |
| <i>Bacillus subtilis</i> HQS-3 | — | 26.0 | 8.0 | 45~50 | Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ | PMSF, EDTA | 丝氨酸-金属蛋白酶 | 文献 [26] |
| <i>Bacillus cereus</i> FF01 | Bacethrombase | 39.5 | 8.0 | 40 | — | PMSF, pBPP | 丝氨酸蛋白酶 | 文献 [27] |
| <i>Bacillus</i> sp. AS-S20-I | Bafibrinase | 32.3 | 7.4 | 37 | — | PMSF, IAA, pBPB | 丝氨酸蛋白酶 | 文献 [19] |
| <i>Bacillus velezensis</i> Z01 | Velefibrinase | 32.3 | 7.0 | 40 | Mg ²⁺ , Ca ²⁺ | Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , PMSF, EDTA | 丝氨酸-金属蛋白酶 | 文献 [28] |
| <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i> | — | 24.5 | 7.0 | 37 | Na ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ | Zn ²⁺ , Cu ²⁺ | — | 文献 [29] |
| <i>Sarocladium strictum</i> | Proteinase III | 35.0 | 10.0 | 30 | — | SBTI, TPCK, PMSF | 丝氨酸蛋白酶 | 文献 [30] |
| <i>Lumbricus rubellus</i> | Lumbrukinase | 20.0 | 7.4~9.0 | 37 | — | LBTI, DFP, SBTI | 丝氨酸蛋白酶 | 文献 [11] |

由表 3 可得以下 9 点结论：

1) 大部分双功能型纤溶酶属于丝氨酸蛋白酶类,少量为金属蛋白酶类,极少数为丝氨酸金属蛋白酶类；

2) 分子质量分布较广泛,从 13.6~51.0 ku 都有报道,但主要集中在 20~35 ku；

3) 最适工作温度以温热为主,温度范围为 30~60 ℃,以 30~50 ℃居多；

4) 最适酸碱度以中性及弱碱性(pH 值为 7.0~8.0)为主,但也有少数为强酸性或碱性条件,如从 *Pleurotus ferulae* 分离得到 3 种不同的双功能纤溶酶,最适 pH 值分别为 4.0,5.0,8.0；

5) 能被丝氨酸蛋白酶抑制剂如苯甲基磺酰氟或金属蛋白酶抑制剂如乙二胺四乙酸所抑制；

6) 对金属离子的适应性差异巨大,以 Ca²⁺, Mg²⁺ 促进剂居多. 这里值得注意的是从 *Aspergillus*

versicolor 中分离的 ZHL-1,十二烷基硫酸钠(SDS)能显著提升其活性,打破了 SDS 能抑制大部分蛋白活性的通识;

7) 都能将纤溶酶原激活成活性的纤溶酶,但激活机制不尽相同;

8) 都能直接降解纤维蛋白及纤维蛋白原,但对 3 条链的降解顺序有所差异. 绝大多数的降解顺序为 $\alpha \rightarrow \beta \rightarrow \gamma$,少数为 $\beta \rightarrow \alpha \rightarrow \gamma$,但从 *Bacillus* sp. nov. SK006 分离的双功能纤溶酶只降解 β 链与 γ 链,不能降解 α 链. 从 *Aspergillus versicolor* 分离的 ZHL-1 只降解 α 链与 γ 链,不能降解 β 链;

9) 可根据酶对人工合成的显色底物的降解速率来初步判断酶的类型. 常用的显色底物主要有纤溶酶显色底物(D-Val-Leu-Lys-pNA)、血浆促肽酶、卷曲蛋白酶和胰蛋白酶的显色底物(N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNA)、纤溶酶底物(H-D-Val-Leu-Lys-pNA)、糜蛋白酶的显色底物(MeO-Succinyl-Arg-Pro-Tyr-pNA)、组织蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、糜蛋白酶等丝氨酸蛋白酶的显色底物(N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA)、激肽释放酶的显色底物(D-Val-leu-Arg-pNA)、尿激酶的显色底物(pyro-Glu-Gly-Arg-pNA)、凝血酶的显色底物(H-D-Phe-Pip-Arg-pNA)、凝血酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶的显色底物(N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-pNA)、凝血酶的显色底物(Tos-Gly-Pro-Arg-pNA).

与上述基本生化特性类似的是,课题组从星虫中分离得到的 3 种 SFE 也都是属于丝氨酸蛋白酶,分子质量为 12.3~29.6 ku,最适 pH 值为 4.0,7.0,8.0,最适温度为 30~40 ℃,活性受 PMSF 的强烈抑制,能将纤溶酶原激活成一种非纤溶酶的活性分子,能够在 20 min 内完全降解纤维蛋白及纤维蛋白原的 α 链,但需要 2 h 才能完全降解 β 链,需要 6 h 才能完全降解 γ 链.

4 问题与展望

众所周知,现有激活剂类溶栓药物必须依赖患者自身的纤溶酶原物质才能发挥溶栓效应,但血栓患者体内的纤溶酶原物质普遍呈低表达或突变状态,严重限制了此类药物的溶栓效果. 纤溶酶类溶栓药物虽然可以直接溶解纤维蛋白,但却容易被血液中的多种抑制因子所抑制,而且对血栓栓体的靶向性也不高. 双功能型纤溶酶的纤溶酶原激酶活性和纤维蛋白降解活性赋予其同时具有纤溶酶原激活剂和活性纤溶酶的双重功效,理论上能够弥补现有溶栓药物的不足. 在这一导向下,双功能型纤溶酶的发现、鉴定、活性研究正成为抗血栓研究的一大热点. 对此,在结合课题组前期大量的星虫纤溶酶研究基础上,对双功能型纤溶酶的物种来源、分离纯化和酶活特性 3 个关键问题进行系统综述.

鉴于双功能型纤溶酶的独特优势,大量的精力已投入到双功能型纤溶酶的挖掘工作中. 到目前为止,除了病毒和古细菌外,其余物种如细菌、真菌、植物和动物都有双功能型纤溶酶的报道. 其中又以细菌和真菌居多,尤其是杆菌和霉菌. 然而,由于绝大部分实验仍然借助加热平板与非加热平板活性差异数值来衡量是否具有激酶活性和直接纤溶活性,忽略了加热平板中的纤维蛋白已经变性,有可能导致纤维蛋白更容易被纤溶酶降解,从而造成具有激酶活性的假阳性结果. 因此,对所报道的双功能型纤溶酶应持谨慎态度.

在纤溶酶的双功能鉴定方面,为了准确鉴定其是否具有双功能效应,课题组经过长期摸索提出一种“六重鉴定法”:

1) 在加热纤维平板与非加热纤维平板中都显示活性,但非加热平板活性大;

2) 在含纤溶酶原的纤维平板与无纤溶酶原的纤维平板中都显示活性,但含纤溶酶原的纤维平板活性大;

3) 与单纯待测样品相比,待测样品与纤溶酶原的反应物在纤维蛋白-Native-PAGE 上显示新的活性条带或更亮的活性条带;

4) 与单纯待测样品相比,待测样品与纤溶酶原的反应物在明胶-Native-PAGE 上显示新的活性条带或更亮的活性条带;

5) 与单纯待测样品相比,待测样品与纤溶酶原的反应物在经 Native-PAGE 后胶条贴在新的纤维蛋白平板中显示新的活性条带或更亮的活性条带;

6) 与单纯待测样品及纤溶酶原样品相比,待测样品与纤溶酶原的反应物在 SDS-PAGE 上显示新的条带.

只有同时满足以上6个鉴定条件才能证明该物质具有双功能效应,同时,可以初步判定出双功能型纤溶酶对纤溶酶原的大概激活位点,为后续的纤溶酶原激活机制和纤维蛋白降解机制提供参考。

在今后的研究中,除了不断挖掘新的双功能型纤溶酶之外,更应该重视其分子机制的研究。只有从机制上掌握了其整个作用过程,才能更好地为将来的升级改造提供参考。由于目前双功能型纤溶酶的研究仍处于新酶种类的发现与活性鉴定阶段,尚未有其结构解析与机制研究的报道。根据课题组对双功能型纤溶酶SFE的蛋白晶体(PDB:8HZO,8HZP)的结构分析及分子模拟,可知SFE与人纤溶酶原激活剂及人纤溶酶的活性口袋非常相似,均由丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸3个氨基酸组成三联体催化中心,但在关键的S1/S2口袋区域则替换了更多的小的氨基酸,这也许就是导致其双功能、多靶点的一些关键因素。相信随着更多的蛋白晶体的解析,其分子机制会得到更为深入系统的阐明。

参考文献:

- [1] RASKOB G E, ANGCHAI SUK S I R I P, BLANCO A N, *et al.* Thrombosis: A major contributor to global disease burden[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2014, 134(5): 931-938. DOI:10.1161/ATVBAHA.114.304488.
- [2] HASANPOUR A, ESMAEILI F, HOSSEINI H, *et al.* Use of mPEG-PLGA nanoparticles to improve bioactivity and hemocompatibility of streptokinase: *In-vitro* and *in-vivo* studies [J]. *Materials Science and Engineering C*, 2020, 118(1): 111427. DOI:10.1016/j.msec.2020.111427.
- [3] OZKAN M, CAKAL B, KARAKOYUN S, *et al.* Thrombolytic therapy for the treatment of prosthetic heart valve thrombosis in pregnancy with low-dose, slow infusion of tissue-type plasminogen activator[J]. *Circulation*, 2013, 128(5): 532-540. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001145.
- [4] TAQIYAH A, MOZAMMEL H M, ABDUL M M. Bacterial proteases as thrombolytics and fibrinolytics[J]. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 16(2): 255-269. DOI:10.3329/dujps.v16i2.35265.
- [5] ELADIO S, RENZO F O, VALERIA A, *et al.* Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: Structural, biochemical features and therapeutic potential[J]. *Toxins*, 2017, 9(12): 392. DOI:10.3390/toxins9120392.
- [6] BONNARD T, LAW L S, TENNANT Z, *et al.* Development and validation of a high throughput whole blood thrombolysis plate assay[J]. *Rep*, 2017, 7(1): 2346. DOI:10.1038/s41598-017-02498-2.
- [7] SHARMA C, SALEM G E M, SHARMA N, *et al.* Thrombolytic potential of novel thiol-dependent fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* RSA1[J]. *Biomolecules*, 2019, 10(1): 1-23. DOI:10.3390/biom10010003.
- [8] 马艳春, 宋立群, 肖洪彬, 等. 地龙药理作用研究进展概况 [J]. *中国临床保健杂志*, 2009, 12(4): 436-438. DOI:10.3969/j.issn.1672-6790.2009.04.046.
- [9] 王跃驹. 植物生产口服索玛鲁泰(Semaglutide)与蚓激酶的融合蛋白降糖胶囊的应用: 201910550611.6[P]. 2019-06-24.
- [10] 曹晓岚, 关新华, 孙西庆, 等. 复方地龙胶囊治疗脑卒中的临床研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2003, 1(5): 271-273. DOI:10.3969/j.issn.1672-1349.2003.05.014.
- [11] HISASHI M, HIROYUKI S, TOMOYUKI Y, *et al.* A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*[J]. *The Japanese Journal of Physiology*, 1991, 41(3): 461-472. DOI:10.2170/jjphysiol.41.461.
- [12] LIU Hai, YANG Jian, LI Yamei, *et al.* A novel fibrinolytic protein from *pheretima vulgaris*: Purification, identification, antithrombotic evaluation, and mechanisms investigation [J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8(1): 772419. DOI:10.3389/FMOLB.2021.772419.
- [13] JONATAN M, NUGRAHA R A, WARDHANA Y A P, *et al.* Ps 16-25 cardioprotective of oral lumbricinase purified and extracted from earthworm (*lumbricus rubellus*) as novel oral fibrinolytic therapy in improving coronary blood flow[J]. *Journal of Hypertension*, 2016, 34(1): e471-e471. DOI:10.1097/01.hjh.0000501256.60006.c5.
- [14] YANG Wangqing, WANG Wenjie, MA Yunnan, *et al.* Bioevaluation of *pheretima vulgaris* antithrombotic extract, PvQ, and isolation, identification of six novel PvQ-derived fibrinolytic proteases[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26(16): 4946. DOI:10.3390/MOLECULES26164946.
- [15] WANG Cong, DU Ming, ZHENG Dongmei, *et al.* Purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis* Natto B-12[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(20): 9722-9729. DOI:10.1021/jf901861v.

- [16] HU Yuanliang, YU Dan, WANG Zhaoting, *et al.* Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-10. DOI: 10. 1038/s41598-019-45686-y.
- [17] VIJAYARAGHAVAN P, PRAKASH V S G, VALAN A M, *et al.* Bioconversion of agro-industrial wastes for the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus halodurans* IND18: Purification and biochemical characterization [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2016, 20(2): 1-8. DOI: 10. 1016/j. ejbt. 2016. 01. 002.
- [18] ZHAO Lihong, LIN Xiuping, FU Jingyun, *et al.* A novel bi-functional fibrinolytic enzyme with anticoagulant and thrombolytic activities from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* ZLH-1[J]. Marine Drugs, 2022, 20(6): 356-356. DOI: 10. 3390/MD20060356.
- [19] ASHIS K M, SUDHIR K R, RUPAMONI T, *et al.* Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits *in vivo* anticoagulant activity and thrombolytic potency[J]. Biochimie, 2012, 94(6): 1300-1308. DOI: 10. 1016/j. biochi. 2012. 02. 027.
- [20] LI Guanlong, LIU Xiaolan, CONG Shanzi, *et al.* A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 168(1): 631-639. DOI: 10. 1016/J. IJBIOMAC. 2020. 11. 118.
- [21] CHOI J H, KIM D W, KIM S, *et al.* Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae* [J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2017, 47(6): 539-546. DOI: 10. 1080/10826068. 2016. 1181083.
- [22] CHOI B S, SAPKOTA K, CHOI J H, *et al.* Herinase: A novel bi-functional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom, *hericium erinaceum* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(3): 609-622.
- [23] HUA Ying, JIANG Bo, MINE Y, *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(4): 1451-1457. DOI: 10. 1021/jf0713410.
- [24] WANG S H, ZHANG C, YANG Y L, *et al.* Screening of a high fibrinolytic enzyme producing strain and characterization of the fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus subtilis* LD-8547[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 24(4): 475-482. DOI: 10. 1007/s11274-007-9496-2.
- [25] KIM W, CHOI K, PARK H, *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(7): 2482-2488. DOI: 10. 1128/AEM. 62. 7. 2482-2488. 1996.
- [26] HUANG Shihai, PAN Shihan, CHEN Guiguang, *et al.* Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62(4): 124-130. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2013. 08. 048.
- [27] MAJUMDAR S, DUTTA S, DAS T, *et al.* Antiplatelet and antithrombotic activity of a fibrin(ogen)olytic protease from *Bacillus cereus* strain FF01[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79(1): 477-489. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2015. 04. 075.
- [28] ZHOU Yuting, CHEN Huizhen, YU Bo, *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from marine *Bacillus velezensis* Z01 and assessment of its therapeutic efficacy *in vivo* [J]. Microorganisms, 2022, 10(5): 843. DOI: 10. 3390/MICROORGANISMS10050843.
- [29] ZHANG Shuli, WANG Yingdong, ZHANG Nan, *et al.* Purification and characterisation of a fibrinolytic enzyme from *Rhizopus micro sporus* var. *tuberosus* [J]. Food Technology and Biotechnology, 2015, 53(2): 243-248. DOI: 10. 17113/ftb. 53. 02. 15. 3874.
- [30] KORNIENKO E I, OSMOLOVSKIY A A, KREYER V G, *et al.* Characteristics and properties of the complex of proteolytic enzymes of the thrombolytic action of the micromycete *Sarocladium strictum* [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2021, 57(1): 57-64. DOI: 10. 1134/S0003683821010129.
- [31] CHOI J H, SAPKOTA K, KIM S, *et al.* Starase: A bi-functional fibrinolytic protease from hepatic caeca of *Asterina pectinifera* displays antithrombotic potential[J]. Biochimie, 2014, 105(10): 45-57. DOI: 10. 1016/j. biochi. 2014. 06. 012.