

肝素酶在医药领域应用的研究进展

刘文丽¹, 蒋莹子¹, 赵丽青¹, 张培新¹, 王淑兰²

1 深圳大学 化学与环境工程学院, 广东 深圳 518060

2 东北大学 理学院, 辽宁 沈阳 110819

刘文丽, 蒋莹子, 赵丽青, 等. 肝素酶在医药领域应用的研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(12): 1953–1962.

Liu WL, Jiang YZ, Zhao LQ, et al. Research progress of heparinase in the field of medicine. Chin J Biotech, 2018, 34(12): 1953–1962.

摘要: 肝素酶是一类能够特定切割肝素或硫酸乙酰肝素中 α -1,4 糖苷键并将其裂解成有活性寡糖片段的酶, 主要分为真核生物肝素酶 (Heparanase) 和原核生物肝素酶 (Heparinase)。由于原核生物肝素酶是一种高效绿色的生物催化剂, 因此近年来在医药领域的应用性研究逐渐被重视。文中结合本课题组相关工作, 归纳介绍了原核生物肝素酶通过作用于硫酸肝素蛋白聚糖 (HSPGs) 生成肝素小分子, 抑制肿瘤细胞增殖方面的应用; 原核生物肝素酶在制备第三代创新型抗凝血药物低分子量肝素 (Low molecular weight heparin, LWMH) 和超低分子量肝素 (Ultra low molecular weight heparin, ULMWH) 方面的应用; 原核生物肝素酶作为肝素拮抗药物等医药领域的重要应用; 并展望了原核生物肝素酶的未来应用前景及挑战。

关键词: 肝素酶, 肿瘤治疗, 肝素拮抗药物, 低分子量肝素, 超低分子量肝素

Research progress of heparinase in the field of medicine

Wenli Liu¹, Yingzi Jiang¹, Liqing Zhao¹, Peixin Zhang¹, and Shulan Wang²

1 College of Chemical and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

2 College of Sciences, Northeastern University, Shenyang 110819, Liaoning, China

Abstract: Heparinases can produce biologically active oligosaccharides by specifically cleaving the α -(1,4) glycosidic linkages of heparin and heparan sulphate. Heparinases are divided into heparinase and heparanase. Because heparinase is an effective biocatalyst, more and more researchers pay attention to the application of heparinase in medical field in the recent years. Combined with the related research work in our group, the application value of heparinase in the medical field was summarized, such as the determination of the structure of heparin, the preparation of low-molecular-weight heparin and

Received: February 22, 2018; **Accepted:** April 27, 2018

Supported by: The 60th Financial Grant from China Postdoctoral Science Foundation (No. 2016M602534), the Youth Innovation Talents Project of General Higher School in Guangdong Province (No. 2016KQNCX144), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21606152, 31701621), the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. 2016A030313053), the Special Fund for Development of Strategic Emerging Industries in Shenzhen (No. JCYJ20160520174823939).

Corresponding author: Liqing Zhao. Tel/Fax: +86-755-26770395; E-mail: snowzlj@163.com

中国博士后科学基金第 60 批面上项目 (No. 2016M602534), 广东省普通高校青年创新人才项目 (No. 2016KQNCX144), 国家自然科学基金 (Nos. 21606152, 31701621), 广东省自然科学基金-自由申请项目 (No. 2016A030313053), 深圳市战略新兴产业发展专项资金 (No. JCYJ20160520174823939) 资助。

网络出版时间: 2018-05-14

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180511.1800.004.html>

ultra-low-molecular-weight heparin, tumor therapy and as a heparin antagonist. In addition, we summarized the definition, source of heparinase and its application in the medicine field. Heparinases have a great application prospect in the field of medicine.

Keywords: heparinase, tumor therapy, heparin antagonists, low-molecular-weight heparin, ultra low molecular weight heparin

肝素酶是一类能够特定切割肝素或硫酸乙酰肝素中 α -1,4 糖苷键并将其裂解为有活性寡糖片段的酶,因其高效、绿色的特点吸引了科研工作者对其在医药领域应用的研究兴趣。目前,国内外对乙酰肝素酶在医药领域应用的综述比较多,对于肝素酶在医药领域应用的研究综述较少。与以前的肝素酶综述相比,笔者结合本课题组近几年对原核生物肝素酶研究的结果,综述了原核生物肝素酶通过作用于硫酸肝素蛋白聚糖 (HSPGs) 生成肝素小分子,抑制肿瘤细胞增殖方面的应用;原核生物肝素酶在制备第三代创新型抗凝血药物低分子量肝素 (Low molecular weight heparin, LWMH) 和超低分子量肝素 (Ultra low molecular weight heparin, ULMWH) 方面的应用;原核生物肝素酶作为肝素拮抗药物等医药领域的重要应用。其中利用课题组自筛选的拉乌尔菌属 *Roultella* sp. NX-TZ-3-15 和普罗威登斯菌属 *Providencia* NX-XC-12 产生的原核生物肝素酶已成功制备出分子量和 Factor Xa: IIa 活性均具有优势的超低分子肝素 ULMWH。

1 肝素酶简介

1.1 肝素酶的定义和分类

肝素 (Heparin, HP) / 硫酸乙酰肝素 (Heparan

sulfate, HS), 是由 D-乙酰氨基葡萄糖中 20–100 个不饱和单元形成的线性链组成的,其中 D-乙酰氨基葡萄糖通过 α -1,4 糖苷键连接到葡萄糖醛酸上,其结构见图 1^[1-2]。

HP/HS 是粘多糖 (Glycosaminoglycans, GAGs) 中的一员,具有一定的生理功能,一般用作抗凝血药物等^[3]。现发现不管真核生物还是原核生物,都会产生降解 HP/HS 的酶,这些真核生物和原核生物体内的内切酶 (糖苷内切酶) 可以特定切开 HP/HS 残基中多聚糖链内的糖苷键,因此统称这一类酶为肝素酶^[3]。其中,真核生物产生的肝素酶称为类肝素酶或乙酰肝素酶 (Heparanase),是以水解方式降解 HS,而原核生物产生的肝素酶称为原核生物肝素酶,是以裂解的方式降解 HP 或 HS。Heparanase 能够水解硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPGs) 的肝素类侧链破坏细胞外基质 (ECM) 和基底膜 (BM) 的基本结构,从而释放并激活连接在 Heparin 类侧链上的活性物质,它与血管生成、肿瘤转移、炎症等病理过程密切相关^[3]。Heparanase 在人类肿瘤中是优先表达的,在低转移性肿瘤组织细胞中的过度表达能促进肿瘤细胞扩散和血管化,从而引起癌症的恶化。而在非侵入性和非免疫组织中表达的 Heparanase 对在胚胎

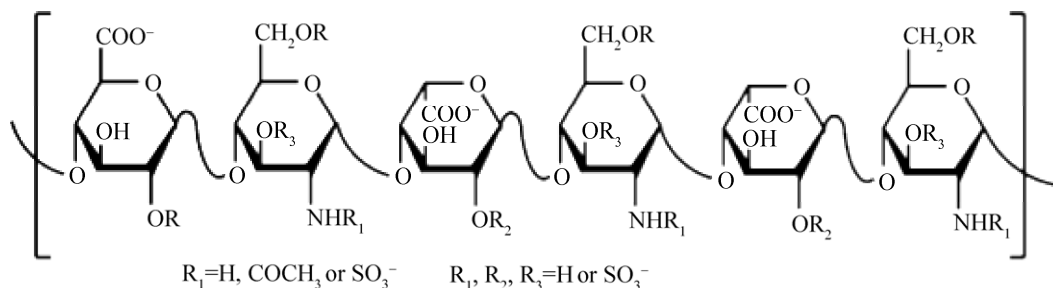


图 1 肝素结构示意图

Fig. 1 Structure diagram of Heparin.

发育和成人阶段的组织成形、再生和修复等方面有重要作用。酶原和活性状态的 Heparanase 对成骨细胞^[4]、神经系统发育和神经细胞分化^[5-7]等生物功能有重要作用。微生物源肝素酶主要分 3 种：原核生物肝素酶 I (EC 4.2.2.7)、原核生物肝素酶 II、原核生物肝素酶 III (乙酰肝素酶, EC 4.2.2.8)。这 3 种纯化的原核生物肝素酶, 在切割 HP 和 HS 的能力上有所不同。原核生物肝素酶 I 只能裂解肝素, 裂解肝素重复单位中的 $H_{NS.6X-IIS}$ 键, 产生 Δ -4,5 位不饱和糖醛酸, 留下 1 个还原性末端; 原核生物肝素酶 II 底物选择性最宽, 对 HP 和 HS 中的 $H_{NY.6X-U_{2x}}$ 键均有切割作用; 原核生物肝素酶 III 特定切割 HS, 切割 H_{NAC-I} 和 $H_{NY.6X-G}$ 键。其中, 原核生物肝素酶 I 和原核生物肝素酶 III 需要钙离子激活, 而原核生物肝素酶 II 不需要钙离子激活。

1.2 肝素酶的来源

1.2.1 真核生物来源的 Heparanase

真核生物来源的 Heparanase 主要表达于细胞非浸润组织和非免疫组织, 负责人类胚胎发育和成人阶段的组织形成、修复和再生; 优先表达于低转移性的肿瘤细胞, 如黑色素瘤和癌症细胞^[8-10]等, 促进肿瘤细胞的入侵和血管化, 导致癌症的发生。

1.2.2 微生物来源的原核生物肝素酶

原核生物肝素酶最早是从肝素黄杆菌 *Pedobacter heparinus* (前人称其为 *Flavobacterium heparinum*) 中发现的, *P. heparinus* 是一种能够裂解 Heparin 的微生物, 同时还会产生外切糖苷酶、磷酸二酯酶和磺胺类酶等进一步作用于酶解产生的低聚糖产物。

除了从 *P. heparinus* 中分离出原核生物肝素酶外, 国内外学者还先后从鞘氨醇杆菌属和芽孢杆菌属中分离出原核生物肝素酶, 这些细菌主要来源于

土壤^[11]和食物研磨废物^[12]。此外, 近些年还有一些学者发现分别来源于人体肠道、人体牙周和土壤中的粪便拟杆菌 *Bacteroides stercoris*^[13]、黄曲霉 *Aspergillus flavus*^[14] 和不动杆菌 *Acinetobacter*^[15] 产生原核生物肝素酶, 但至今尚不明确土壤细菌产生原核生物肝素酶的原因, 猜测可能是土壤细菌可利用原核生物肝素酶去降解腐尸中的 GAGs。据报道, 从人类肠道中分离出的粪便拟杆菌 *B. stercoris* HJ-15 能够产生原核生物肝素酶^[13]。所有这些原核生物肝素酶在 pH 8.5-10 下都是带正电荷的, 这可能与可降解高度聚阴离子基质的天然本质有关。这些酶与从 *P. heparinus* 中分离出的原核生物肝素酶相比, 在分子量、等电点、氨基酸组成以及动力学性质上都有所不同。此外, 利用抗体实验、氨基酸分析测序、肽质量指纹图谱以及 DNA 印迹法等方法比较来自于不同细菌的原核生物肝素酶, 发现没有很大的相似性。Yoshida 等^[16-18] 研究表明, *Bacillus circulans* 在基因序列上和推导出的氨基酸序列上与酸性多糖裂解酶家族用以降解硫酸软骨素和透明质酸的酶有部分相似^[17]。Hyun 等^[13] 的研究表明 *B. stercoris* HJ-15 的重组原核生物肝素酶 III 与来自 *P. heparinus* 的原核生物肝素酶 II 有 70% 的同源性。Dzvova 等的研究表明铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 能够产生原核生物肝素酶, 类似于原核生物肝素酶 II^[19]。Chaudhary 等从韩国京畿大学的森林土壤中分离出菌株 *Pedobacter kyonggii* K-4-11-1 能够产生原核生物肝素酶^[20]。作者所在课题组于 2017 年于土壤中分离出 *Roultella* sp. NX-TZ-3-15 和 *Providencia* NX-XC-12, 经天青 A 法证实均产生原核生物肝素酶, 并经过初步分离纯化, 目前已达到电泳级纯度。现已报道的和笔者分离出的一些原核生物肝素酶的来源及基本性质见表 1。

表 1 原核生物肝素酶来源及基本性质

Table 1 Source of strain producing heparinase and basic property of heparinase

Microbiology and source	Type of heparinase	Optimum temperature (°C)	Molecular weight (Da)	Optimum pH	Isoelectric point	Reference
<i>Pedobacter heparinus</i> ATCC1312 Soil	Heparinase II	40	85 765	7.3 (Heparin) 6.9 (Heparan sulfate)	9.1–9.2	[21]
<i>Bacteroides stercoris</i> HJ-15 NCB146506 Human tract	Heparinase III	45	73 202	7.6 (Heparan sulfate)	9.6–9.9	[18]
	Similar to heparinase I	50	48 000	7.0	9.0	[13]
<i>Bacteroides heparinolyticus</i> ATCC 35895 Human periodontal damage	Similar to heparinase I	–	63 000	6.5	9.5	[22]
<i>Spingobacterium</i> sp.	Similar to heparinase II	–	75 674	6.5	–	[11]
<i>Bacillus circulans</i> NCBI 1397	Similar to heparinase II	40–45	111 000	7.5	–	[12]
<i>Bacillus</i> sp. FERM BP2613	Similar to heparinase II	40–50	120 000	7.5	–	[17]
<i>Roultella</i> sp. NX-TZ-3-15	Similar to heparinase II/III	–	60 000	6.5	–	Unpublished
<i>Providencia</i> NX-XC-12	–	–	–	6.0	–	Unpublished

2 Heparinase 在医药领域的应用

2.1 Heparinase 在肿瘤治疗中的应用

众所周知，癌症的肿瘤细胞增殖和二次转移是不可控制的。肿瘤组织可分为 3 个室 (Compartments)，分别为肿瘤细胞室、内皮细胞室和细胞外基质室 (Extracellular matrix, ECM)，ECM 干涉肿瘤细胞室和内皮细胞室，并且调控整个细胞室。硫酸肝素蛋白聚糖 (Heparan sulphate proteoglycans, HSPGs) 以及结构蛋白是 ECM 细胞表面的重要组成部分。HSPGs 所在的位置有助于调控细胞扩散和转移，从而控制肿瘤的生长和血管生成^[23]。在内皮细胞表面上的 HSPGs

是各种促血管生成生长因子的共受体，如成纤维细胞室生长因子 (FGF)、血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 和抗血管生成因子 (内皮抑素)^[24]。一些研究结果表明 Heparin 对肿瘤扩散、血管生成以及新陈代谢等有一定影响^[25-27]。新血管的形成是肿瘤生长、入侵和新陈代谢过程中的致病中心步骤，肿瘤通过新血管的形成获得养分，而原核生物肝素酶通过作用于 HSPGs，生成 Heparin 小分子，抑制毛细血管内皮细胞的增殖，抑制新血管形成，从而达到抑制肿瘤细胞增殖的作用^[28-29]。原核生物肝素酶 I、II 和 III 的抗血管生成活性不同，导致生成的肝素小分子的功效不同，抑制肿瘤细胞的能力也不同。原核生物

肝素酶 I、II 和 III 抑制新血管形成从而抑制肿瘤增殖的作用机制与其在受体结合水平上改变 FGF 的功能有关^[30-32]，研究发现毛细血管内皮细胞 (EC) 经原核生物肝素酶处理后极大地降低其与 FGF 结合能力，结果表明，经 125 nmol/L 原核生物肝素酶 I 处理后，FGF 的结合能力将损失 95%。FGF 结合硫酸肝素和受体位点的能力减少到 50%，抑制肿瘤细胞增殖的能力也减少到 50%，原核生物肝素酶 I 的浓度为 0.5 nmol/L 和 1.5 nmol/L 时，抑制 FGF 结合的能力最强；当原核生物肝素酶 II 的浓度是 2 nmol/L 和 8 nmol/L 时，抑制 FGF 结合的能力最强；原核生物肝素酶 III 的浓度是 0.15 nmol/L 和 0.2 nmol/L 时，抑制 FGF 结合的能力最强^[34]。

2.2 原核生物肝素酶在研究 HP/HS 精确结构中的应用

HP/HS 作为粘多糖中的一员，分子结构非常复杂，至今该类物质的化学结构和成分分析仍是糖生物化学中的难题之一。研究 HP/HS 的序列是深入了解 HP/HS 结构的有效方法，主要利用原核生物肝素酶 I、II、III 裂解 HP/HS 多糖序列，由于裂解位置的不同，从而获得特定的序列信息。利用原核生物肝素酶裂解 HP/HS 可以直接测定 HP/HS 结构，因为原核生物肝素酶在切割 HP 和 HS 时有着高度的底物专一性，切割 HP 和 HS 中的 α -1,4 糖苷键并产生含有非还原性 4,5-不饱和糖醛酸残基的双糖，这一过程涉及了由一种或多种混合原核生物肝素酶裂解 HP/HS 的过程，是一个由长链解聚成二糖组分的过程，包含非还原末端的己糖醛酸差向异构体在 C4 和 C5 间形成 C=C 双键时消失的结构信息，对于明确由肝素产生的寡糖结构具有非常重要的意义，不仅可以了解 Heparin 与蛋白质的相互作用，还可以确定 Heparin 与蛋白质结合所需的精确结构。Rabenstein^[35]通过原核生物肝素酶 I 裂解 Heparin 获得具有抑制血

管平滑肌细胞活性的小分子 Heparin，研究发现大于 14 个单糖单位的小分子 Heparin 具有完全抑制血管平滑肌的细胞活性。总之，原核生物肝素酶作为一类能够特异性地将肝素粘多糖裂解成有活性的寡糖片段的工具酶，可用于分析 Heparin 类物质及其产生寡糖的结构与功能，从而进一步了解 Heparin 的构效关系，促进 Heparin 类物质的生物化学、生理和病理作用的研究。

2.3 利用原核生物肝素酶制备 LWMH 和 ULWMH

Heparin 是一种糖胺聚糖类天然药物，于 1916 年^[34]被 Mclean 发现具有抗凝血功能。1935 年开始被用作临床抗凝药物，成为仅次于胰岛素的第二大天然产物药物^[35]，全球年产值达 100 亿美元，主要用于暴发性流脑、血栓塞、肾炎、败血症、动脉硬化、急性心肌梗塞等疾病的治疗。我国是世界第一大 Heparin 生产国，近年的 Heparin 产量约占世界总量的 60%。

目前，Heparin 类药物主要有三代：标准 Heparin、LWMH 和 ULWMH。LWMH 是第二代创新型药物，临床应用证明 LWMH 在引起患者血小板减少、骨质疏松、出血等副作用优于 Heparin，因此近年来 LWMH 已取代大部分 Heparin 的市场，现有伊诺肝素 (Enoxaparin)、达肝素 (Dalteparin)、亭扎肝素 (Tinzaparin)、舍托肝素 (Sandoparin)、那曲肝素 (Nadroparin) 等著名药物（一些 LWMH 及性质见表 2）。ULWMH 平均分子量小于 4 000 Da，拥有比 LWMH 更高的抗 FXa 活性和更低的抗 IIa 活性，能够穿透血脑屏障，出血风险更低，在治疗急性缺血性中风等疾病方面副作用更小^[36]，因此成为 Heparin 类抗凝血药物的未来发展趋势。ULWMH 现已开发的产品主要包括：由 ROVI 公司研发的 Bemiparin，在欧洲上市多年；由赛诺菲-安万特研发的 Semuloparin，正在进行临床研究，Bemiparin 和 RO-14 是目前唯一商业化的

ULWMH。1998年, Bemiparin 被允许应用到美国以外的国家, 用于内科病人初级静脉血栓的预防 and 一般的外科手术和整形手术病人二级静脉血栓的预防^[37]。Bemiparin 是通过降解猪小肠粘膜分离的 Heparin 制备得到的^[38], 健康的志愿者服用 Bemiparin 的药物代谢动力学结果表明, Bemiparin 的抗 FXa 活性是随着剂量增加而增加的, 工业化生产的 Bemiparin 抗 FXa 活性/抗 IIa 活性已经达到 8。据统计, 直到 2014 年, Bemiparin 的销售额已经达到 7 270 万欧元, 市场还在进一步拓展, 2015 年, Bemiparin 在中国上市。RO-14 是利用化学降解 Heparin 生产 Bemiparin 的派生物, 健康的志愿者服用 RO-14 药物代谢动力学结果表明 RO-14 具有很好的安全性, 活性和剂量成正比^[39]。Semuloparin 是由赛诺菲-安万特研发的一种用来预防癌症化疗患者静脉血栓的药物, 需要每日连

续给药, 它主要是通过解聚猪粘膜 Heparin 制备得到的^[40]。工业化生产的 Semuloparin 抗 FXa 活性/抗 IIa 活性已达到 80, 其临床 III 期试验在意大利、英国、丹麦、德国、加拿大等多个国家已经展开, 2012 年 2 月发表于 *The New England Journal of Medicine* 杂志上的临床研究结果表明该药能够减少患者血栓的发生, 对患者生存期的延长影响不大, 且存在出血风险, 因此 FDA 拒绝批准该药物, 赛诺菲-安万特公司于 2012 年 7 月停止对该药物的研究^[41-44]。Deligoparin 是国际上研发的第 4 个 ULWMH, 但在研究过程中, 利用 Deligoparin 作为抗炎药物治疗结肠炎患者过程中, 未能达到良好效果, 从而 Deligoparin 的研究被终止^[37]。Fondaparinux 是 2016 年最新报道的超低分子肝素, 可用来治疗视网膜静脉阻塞, 据报道取得了较好的疗效^[46]。

表 2 低分子肝素和超低分子肝素

Table 2 Low molecular weight heparins and ultra low molecular weight heparins

LMWH	Manufacturer	Factor Xa:IIa ratio (D)	Average molecular weight (Da)
Heparin	Rhone-Poulenc Rorer, Avantis		11 400
Enoxaparin	Aspen Pharma, Eurofarma Lab Itda	2.7:1	4 500
Tinzaparin	Barun, Novo/Leo/Dupont	2:1	4 900
Bemiparin	Manus Aktteva Biopharma LLP	8.0:1	3 600
Reviparin	Knoll	4.2:1	4 400
Nadroparin	Sanofi-Winthrop	2.4:1	4 500
Parnaparin	Alfa Wassermann	3:1	4 500-5 000
Dalteparin	Pharmacia-Upjohn Kissei	2.5:1	4 000-6 000
Certoparin	Novartis	2.4:1	5 400
Sandoparin	Novartis, Sandoz	NA	NA
Fondaparinux	Arixtra	NA	1 726.77
Idraparinux	Xarelto	NA	1 727.18
Ardeparin sodium	Wyeth-Ayerst	2.0:1	5 600-6 500
Fondaparinux	Sanofi-Aventis	850/0.1	1 727
AVE 5026	GlaxoSmithKline	80:1	2 400

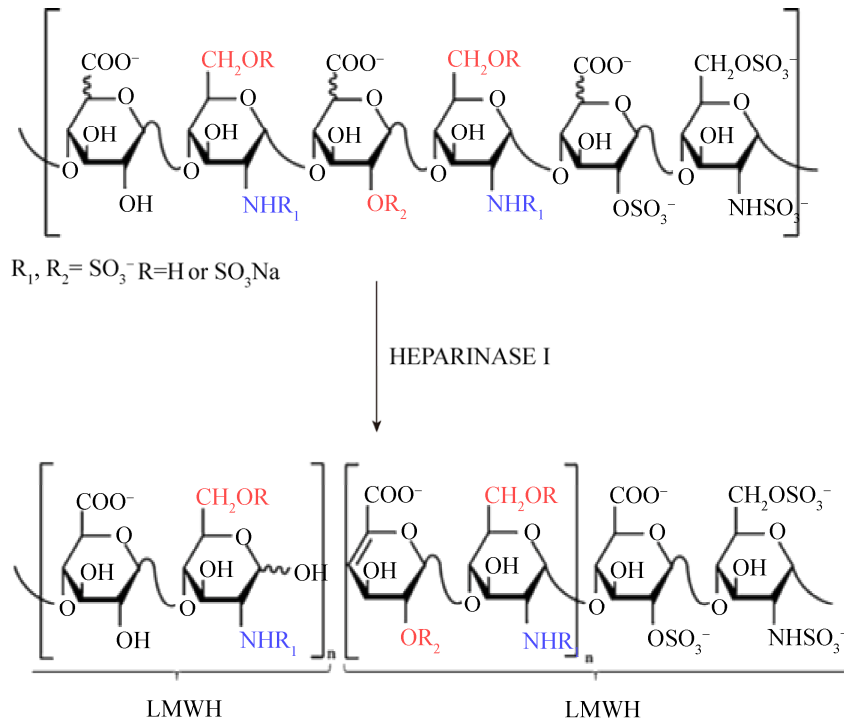


图 2 Heparinase 降解 Heparin 为 LMWH 图解^[45]

Fig. 2 Scheme for enzymatic degradation of heparin to LMWHs^[45].

目前,国内外生产 ULWMH 都是通过化学降解的方法制备的,但化学方法制备的 ULWMH 具有收率低、反应条件剧烈、操作步骤繁琐等缺点,而原核生物肝素酶裂解法作用比较温和且环境友好,是一种比较理想的工业生产方法(图 2)。原核生物肝素酶作用程度是通过测定与产品分子中形成的不饱和糖醛酸残基相关联的吸光度变化来监测的,通过除去酶或使酶失活的方法终止酶促反应。当原核生物肝素酶裂解 Heparin 完全,去除分子量小的副产品(如双糖和四糖),制备得到 ULMWH。

2.4 原核生物肝素酶作为 Heparin 拮抗药物在临床应用的研究

病人在进行心肺转流(CPB)外科手术时,为了抑制凝血系统的激活,需要利用强抗凝血酶来使病人维持全身抗凝状态。在体外循环、心血管外科和其他的人工干预过程中,Heparin 被长期用来作为抗凝血药物来控制血液的凝固。但是,利

用 Heparin 作为抗凝血药物的使用过程中,多达 10%–15%的病人会出现出血并发症。在心血管外科手术过程中,一旦病人手术结束,Heparin 的抗凝作用需要立即失效从而阻止病人的大量出血,临床上使用鱼精蛋白抵抗 Heparin 抗凝血作用,鱼精蛋白早已作为标准 Heparin 拮抗药物投入使用,并已是美国唯一批准使用的肝素拮抗药物,鱼精蛋白的肝素拮抗效率与总的阳离子电荷相关。但它也会产生许多不良反应,包括可造成病人全身性低血压、肺水肿、肺血管收缩以及过敏反应等^[39],因此,取代鱼精蛋白的新型肝素拮抗药物的开发迫在眉睫。

原核生物肝素酶 I 能够特定地使 Heparin 失去活力,因此可作为鱼精蛋白的替代品。一些研究已经证实原核生物肝素酶 I 能够在体外将 Heparin 诱导的抗凝血作用逆转,并且在狗和兔子等动物模型中作为 Heparin 诱导抗凝血拮抗药物与鱼精蛋白进行比较,研究结果表明原核生物肝

素酶 I 作为抗凝血作用的拮抗药物并不改变血液动力学,当剂量达到 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,原核生物肝素酶 I 能够成功地中和 Heparin 的抗凝作用,没有明显的后遗症^[40]。2001 年 Viskov 等^[41]对进行冠状动脉干道手术治疗的 49 名患者进行注射原核生物肝素酶 I 酶解肝素,研究其中和活性和安全性评估,结果发现,对于患者来说,给予 7–10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量的原核生物肝素酶 I,能有效地缩短激活凝血时间 (ACT),原核生物肝素酶 I 不会引起临床上明显的血液动力学或者其他方面的不良反应。此外,原核生物肝素酶 I 在完全消除 Heparin 抗凝血活性的同时只是部分消除抗 Xa 凝血因子的活性,抗 Xa 凝血因子的活性随着原核生物肝素酶代谢肝素后的剩余量的变化而变化。

3 展望

肝素酶在医药领域的应用范围较广泛,可作抗肿瘤治疗新靶点、生产 LWMH 和 ULWMH、作为肝素拮抗药物等。但对于肝素酶应用于一些医药领域的作用机制研究还不是很透彻,深入地阐述肝素酶在医药领域应用的作用机制,将更有利于开发出新的应用领域,有利于改造肝素酶,使其更好地应用于相应的医药领域。同时,解析 HP/HS 微结构和生物活性,将有利于深入了解原核生物肝素酶与底物 Heparin 之间的裂解机制,从而更好地揭示不同微生物来源的原核生物肝素酶的进化关系,提升和发展原核生物肝素酶在各种临床应用上的潜力。

REFERENCES

- [1] Ji SL, Sang Q, Zhang TM. Research process of source control, structure analysis and the relationship between structure and bioactivity of heparin. *Chin Pharm J*, 2012, 47(9): 660–663 (in Chinese).
姬胜利, 桑青, 张天民. 肝素的来源控制、结构分析及结构与生物活性关系的研究进展. *中国药学杂志*,

2012, 47(9): 660–663.

- [2] Weiss RJ, Esko JD, Tor Y. Targeting heparin and heparan sulfate-protein interactions. *Org Biomol Chem*, 2017, 27(27): 5645–5856.
- [3] Fernandes CL, Escouto GB, Verli H. Structural glycobiology of heparinase II from *Pedobacter heparinus*. *J Biomol Struct Dyn*, 2014, 32(7): 1092–1102.
- [4] Ruan J, Trotter TN, Nan L, et al. Heparanase inhibits osteoblastogenesis and shifts bone marrow progenitor cell fate in myeloma bone disease. *Bone*, 2013, 57(1): 10–17.
- [5] Smith PN, Freeman C, Yu D, et al. Heparanase in primary human osteoblasts. *J Orthopaedic Res*, 2010, 28(10): 1315–1322.
- [6] Navarro FP, Fares RP, Sanchez PE, et al. Brain heparanase expression is up-regulated during postnatal development and hypoxia-induced neovascularization in adult rats. *J Neurochem*, 2008, 105(1): 34–45.
- [7] Takahashi H, Matsumoto H, Kumon Y, et al. Expression of heparanase in nestin-positive reactive astrocytes in ischemic lesions of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett*, 2007, 417(3): 250–254.
- [8] Dempsey LA, Brunn GJ, Platt JL. Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(8): 349–351.
- [9] Dempsey LA, Plummer TB, Coombes SL, et al. Heparanase expression in invasive trophoblasts and acute vascular damage. *Glycobiology*, 2000, 10(5): 467–475.
- [10] Gonzalez-Stawinski GV, Parker W, Holzknecht ZE, et al. Partial sequence of human platelet heparitinase and evidence of its ability to polymerize. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Protein Struct Mol Enzymol*, 1999, 1429(2): 431–438.
- [11] Gao NG, Cheng XL, Yang J, et al. Production of a novel heparinase from *Sphingobacterium* sp. *Acta Microbiol Sin*, 2003, 43(6): 813–816.
- [12] Chao YP, Gao NG, Cheng XL, et al. Rapid purification, characterization and substrate specificity of heparinase from a novel species of *Sphingobacterium*. *J Biochem*, 2003, 134(3): 365–371.

- [13] Hyun YJ, Lee JH, Kim DH. Cloning, overexpression, and characterization of recombinant heparinase III from *Bacteroides stercoris* HJ-15. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(3): 879–890.
- [14] Banga J, Tripathi CKM. Purification and characterization of a novel heparin degrading enzyme from *Aspergillus flavus* (Mtcc-8654). *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(4): 1004–1016.
- [15] Banga J, Tripathi CKM. Rapid purification and characterization of a novel heparin degrading enzyme from *Acinetobacter calcoaceticus*. *New Biotechnol*, 2009, 26(1/2): 99–104.
- [16] Yoshida E, Arakawa S, Matsunaga T, et al. Cloning, sequencing, and expression of the gene from *Bacillus circulans* that codes for a heparinase that degrades both heparin and heparan sulfate. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(9): 1873–1879.
- [17] Yoshida E, Sakai K, Tokuyama S, et al. Purification and characterization of heparinase that degrades both heparin and heparan sulfate from *Bacillus circulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(5): 1181–1184.
- [18] Shaya D, Zhao WJ, Garron ML, et al. Catalytic mechanism of heparinase II investigated by site-directed mutagenesis and the crystal structure with its substrate. *J Biol Chem*, 2010, 285(26): 20051–20061.
- [19] Dzvova N, Colmer-Hamood JA, Griswold JA, et al. Isolation and characterization of HepP: a virulence-related *Pseudomonas aeruginosa* heparinase. *BMC Microbiol*, 2017, 17: 233.
- [20] Chaudhary DK, Lee SD, Kim J. *Pedobacter kyonggii* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from forest soil. *Int J Systemat Evol Microbiol*, 2017, 67: 5120–5127.
- [21] Han C, Spring S, Lapidus A, et al. Complete genome sequence of *Pedobacter heparinus* type strain (Him 762-3^T). *Stand Genom Sci*, 2009, 1(1): 54.
- [22] Nakamura T, Shibata Y, Fujimura S. Purification and properties of bacteroides heparinolyticus heparinase (Heparin Lyase, EC 4.2.2.7). *J Clin Microbiol*, 1988, 26(5): 1070–1071.
- [23] Sanderson RD. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Seminars Cell Dev Biol*, 2001, 12(2): 89–98.
- [24] Juczevska M, Chydzewski L. Angiogenesis in cancer. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku*, 1996, 42 Suppl 1: 86–100.
- [25] Collen A, Smorenburg SM, Peters E, et al. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis *in vitro*. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 6196–6200.
- [26] Hasan J, Shnyder SD, Clamp AR, et al. Heparin octasaccharides inhibit angiogenesis *in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(22): 8172–8179.
- [27] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1–8.
- [28] Shteingauz A, Boyango I, Naroditsky I, et al. Heparanase enhances tumor growth and chemoresistance by promoting autophagy. *Cancer Res*, 2015, 75(18): 3946–3957.
- [29] Heyman B, Yang YP. Mechanisms of heparanase inhibitors in cancer therapy. *Exp Hematol*, 2016, 44(11): 1002–1012.
- [30] Liu DF, Pojasek K, Shriver Z, et al. Heparinase III and uses thereof: US, 6869789. 2005-03-22.
- [31] Raman K, Kuberan B. Differential effects of heparitinase I and heparitinase III on endothelial tube formation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(2): 191–193.
- [32] Sasisekharan R, Moses MA, Nugent MA, et al. Method for inhibiting angiogenesis using heparinase: US, 5567417, 1996-10-22.
- [33] Garg HG, Cindhuchao N, Quinn DA, et al. Heparin oligosaccharide sequence and size essential for inhibition of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Carbohydr Res*, 2002, 337(21/23): 2359–2364.
- [34] Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest*, 2004, 126(3): 188S–203S.
- [35] Rabenstein DL. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *NatProd Rep*, 2002, 19(3): 312–331.
- [36] Ma Q, Dudas B, Hejna M, et al. The blood-brain barrier accessibility of a heparin-derived oligosaccharides C3. *Thrombosis Res*, 2002, 105(5): 447–453.

- [37] Walenga JM, Lyman GH. Evolution of heparin anticoagulants to ultra-low-molecular-weight heparins: a review of pharmacologic and clinical differences and applications in patients with cancer. *Crit Rev Oncol/Hematol*, 2013, 88(1): 1–18.
- [38] Ciccone MM, Cortese F, Corbo F, et al. Bemiparin, an effective and safe low molecular weight heparin: a review. *Vasc Pharmacol*, 2014, 62(1): 32–37.
- [39] Rico S, Antonijuan RM, Gich I, et al. Safety assessment and pharmacodynamics of a novel ultra low molecular weight heparin (RO-14) in healthy volunteers—a First-Time-In-Human single ascending dose study. *Thrombosis Res*, 2011, 127(4): 292–298.
- [40] Jeske WP, Hoppensteadt D, Gray A, et al. A common standard is inappropriate for determining the potency of ultra low molecular weight heparins such as semuloparin and bemiparin. *Thrombosis Res*, 2011, 128(4): 361–367.
- [41] Viskov C, Just M, Laux V, et al. Description of the chemical and pharmacological characteristics of a new hemisynthetic ultra-low-molecular-weight heparin, Ave5026. *J Thrombosis Haemost*, 2009, 7(7): 1143–1151.
- [42] Dubruc C, Karimi-Anderesi N, Lunven C, et al. Pharmacokinetics of a new, ultra-low molecular weight heparin, semuloparin (AVE5026), in healthy subjects. Results from the first phase I studies. *Blood*, 2009, 114: 1073.
- [43] Lassen MR, Fisher W, Mouret P, et al. Semuloparin for prevention of venous thromboembolism after major orthopedic surgery: results from three randomized clinical trials, Save-Hip1, Save-Hip2 and Save-Knee. *J Thrombosis Haemost*, 2012, 10(5): 822–832.
- [44] Kakkar AK, Agnelli G, Fisher WD, et al. The ultra-low-molecular-weight heparin semuloparin for prevention of venous thromboembolism in patients undergoing major abdominal surgery. *Blood*, 2010, 116: 188.
- [45] Bhushan I, Alabbas A, Sistla JC, et al. Heparin depolymerization by immobilized heparinase: a review. *Int J Biol Macromol*, 2017, 9: 721–730.
- [46] Steigerwalt RD Jr, Pascarella A, De Angelis, et al. An ultra-low-molecular-weight heparin, fondaparinux, to treat retinal vein occlusion. *Drug Discov Therapeut*, 2016, 10(3): 167–171.

(本文责编 郝丽芳)