

肝素酶研究进展*

陈 银^{a)} 叶逢春 况 莹 邢新会^{**}

(清华大学化学工程系生物化工研究所 北京 100084)

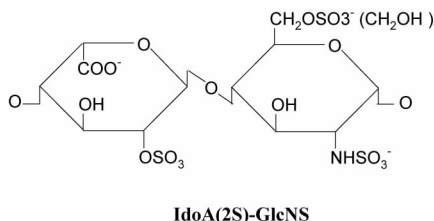
摘要 微生物肝素酶是一类作用于肝素和类肝素的多糖裂解酶,在低分子肝素的制备以及肝素类分子的结构解析等领域具有十分重要的应用前景。结合微生物基因组测序的最新进展,综述微生物肝素酶的来源,并对肝素酶的作用机理加以讨论;结合实验室研究对肝素酶的重组表达及其在低分子肝素生产应用的最新进展进行综述,并对肝素酶其它潜在的应用进行了讨论。

关键词 肝素酶 肝素 纯化 重组表达 应用

中图分类号 Q814

肝素酶 (heparinases) 是一类作用于肝素 (heparin) 或者硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate) 分子的多糖裂解酶 (图 1), 其重要用途之一是降解大分子肝素生产低分子量肝素 (low molecular weight heparin, LMWH)。自从 Payza 等^[1] 在肝素黄杆菌 (*Flavobacterium heparinum*) 中发现肝素酶以来, 人们对肝素酶以及肝素酶生产菌作了广泛的研究, 同时发现在许多微生物中都存在肝素酶。但目前只有肝素黄杆菌和环状芽孢杆菌的肝素酶基因得到了克隆和表达, 而商品化的肝素酶都来源于肝素黄杆菌。肝素酶具有许多重要的用途, 包括低分子量肝素及肝素寡糖的制备, 肝素及肝素类分子的结构测定等, 因此, 肝素酶的高效生产技术研究是备受关注的研究课题。但由于传统的肝素酶

heparin



生产主要采用肝素黄杆菌, 生产效率低和分离纯化过程的复杂, 导致肝素酶成本高, 限制了肝素酶的应用。由于肝素酶的分离纯化和酶学性质已有文献综述^[2], 本文将着重结合微生物基因组测序的最新进展, 对肝素酶的潜在来源加以讨论; 结合本实验室对肝素酶的重组表达研究的最新进展进行综述, 并对肝素酶潜在的应用价值展开讨论。

1 微生物肝素酶的来源

1.1 肝素酶生产菌

肝素酶的活性在许多微生物中已被发现, 包括肝素黄杆菌 (*Flavobacterium heparinum*)^[3,4]、芽孢杆菌 (*Bacillus*)^[5,6]、拟杆菌 (*Bacteroides*)^[7,8] 等 (表 1)^[3-17]。肝

heparin sulfate

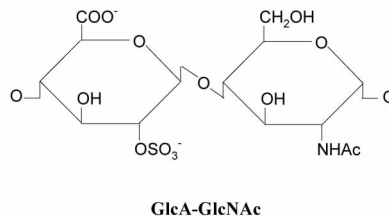


图 1 肝素和硫酸乙酰肝素的主要结构单元

Fig.1 Representative structure units of heparin and heparin sulfate

IdoA(2S): 2-O-sulfo- α -D-iduronic acid; GlcNS: 2-sulfamido- α -D-glucopyranosyl; GlcA: β -D-glucuronic acid;

GlcNAc: 2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucopyranosyl

收稿日期: 2007-04-01 修回日期: 2007-04-17

* 国家自然科学基金资助项目 (20336010, 20676071)

** 通讯作者, 电子信箱: xhxing@tsinghua.edu.cn.

a) 现通讯地址 Department of Biology, The University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, United Kingdom

素黄杆菌是所有肝素酶生产菌中研究最多的一株, 由 Payza 等^[1] 从土壤中分离得到 (后通过 16S rRNA 序列分析重新命名为 *Pedobacter heparinus*)。Bohmer 等^[3] 随后从肝

素黄杆菌中分离纯化得到肝素酶 III,并同时确立了利用 232 nm 光吸收测量肝素酶酶活的方法。Lohse 等^[4]建立了利用色谱同时纯化肝素酶 I、II 和 III 的实验方案并纯化得到肝素酶 II。目前,基因序列已知的肝素酶生产菌还包括环状芽孢杆菌^[5],该菌所产的肝素酶的性质与肝素黄杆菌

的肝素酶 II 类似(表 1)。其基因序列(AB073927)全长 3150bp,编码 1050 个氨基酸,前 52 个氨基酸可能编码信号肽序列,并存在三个可能的钙离子激活位点和三个可能的肝素结合位点^[6]。

表 1 微生物肝素酶的来源及基本性质

Bacterial heparinases	Molecular weight(kDa)	Optimum pH	Optimum temperature(℃)	Main characteristics	References
Heparinase I(<i>F. heparinum</i>)	43	6.5	30	Mainly degrades heparin, exolytical enzyme	[4]
Heparinase II(<i>F. heparinum</i>)	85	7.0	30	Degrades both heparin and heparin sulfate, endolytic enzyme	[4]
Heparinase III(<i>F. heparinum</i>)	73	7.6	45	Mainly degrades heparin sulfate	[3,4]
Heparinase(<i>Bacillus circulans</i>)	111	7.5	45	Degrades heparin($V_{max} = 7.1 \mu\text{g}/\text{mg}/\text{min}$, $K_m = 6.8 \mu\text{M}$) and heparin sulfate($V_{max} = 6.0 \mu\text{g}/\text{mg}/\text{min}$, $K_m = 5.9 \mu\text{M}$)	[6]
Heparinase I(<i>Bacteroides stercoris</i>)	48	7.0	50	Mainly degrades heparin($V_{max} = 8.8 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$, $K_m = 13 \mu\text{M}$)	[11]
Heparinase III(<i>Bacteroides stercoris</i>)	70	7.2	42	Degrades heparin($V_{max} = 38.2 \mu\text{M}$, $K_m = 90.5 \mu\text{M}$) and heparin sulfate($V_{max} = 658.4 \mu\text{M}$, $K_m = 15.3 \mu\text{M}$)	[7,8]
Acharan sulfate lyases I、II、III (<i>Bacteroides stercoris</i>)				Mainly degrade acharan sulfate, also degrade heparin and heparin sulfate	[9]
Heparinase I(<i>Sphingobacterium</i> sp.)	96.8	7.0	37	Degrades heparin, exolytical enzyme	[12]
Heparinase II(<i>Sphingobacterium</i> sp.)	68	6.5	45	Degrades both heparin and heparin sulfate, endolytic enzyme	[12]
Heparinase III(<i>Sphingobacterium</i> sp.)	70.1	7.0	49	Degrades heparin sulfate, endolytic enzyme	[12,14]
Heparinase(<i>Bacillus subtilis</i>)	-	6.5	37	Degrades heparin	[17]

值得注意的是, Kim 等^[11]纯化出三种与肝素黄杆菌肝素酶 II 类似的 acharan sulfate lyase。这三种酶与肝素黄杆菌肝素酶 II 性质类似,氨基酸序列也与肝素黄杆菌肝素酶 II 的同源性相对较高。这三种酶虽然主要作用于 acharan sulfate,但是对肝素和硫酸乙酰肝素也有相当的降解作用。

从肝素酶生产菌的来源来看,肝素酶主要来自 *Cytophaga* - *Flexibacter* - *Bacteroides* (CFB group)的菌株,包括 *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Bacteroides* 和 *Sphingobacterium* 等。其中 *Pedobacter* 属和 *Flavobacterium* 属中的许多种都能在肝素培养基中生长,包括 *P. africanus*, *P. saltans*, *P. himalayensis* 等^[18,19]。目前纯化分离的肝素酶生产菌可能仅

仅是 CFB group 中的一小部分。

1.2 微生物基因组中肝素酶同源基因

近年来,随着基因组测序技术的迅猛发展,越来越多的微生物基因组序列被测定,从而为肝素酶基因的发现提供了一个新思路。截至目前,在 NCBI 数据库中 共有 789 种细菌和古菌的基因组已公布。通过对 *F. heparinum* 的肝素酶 I、II、III 以及 *B. circulans* 的肝素酶的检索发现数十种可能的肝素酶同源基因(表 2),其来源除 *Bacteroidetes* 外,还包括 *Proteobacteria*, *Firmicutes* 和 *Acidobacteria*;其中 *Bacteroides thetaiotaomicron* 的肝素酶同源基因最近被实验证实其表达产物具有肝素酶的活性^[20]。肝素酶的来源可能远比之前预期的要广。

表 2 微生物基因组中可能的肝素酶同源基因

Organisms	Protein (Accession no.)	Score	E value	Classification	Comments
Heparinase I					
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI - 5482 ^{b)}	NP_813586.	501	2e-140	<i>Bacteroidetes</i>	Anaerobic, typically found in the intestinal microflora of mammals, symbionts, opportunistic pathogens
<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	-	497	8e-139	<i>Bacteroidetes</i>	Anaerobic, being sequenced as part of the human gut microbiome project, symbionts
Heparinase II					
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	NC_007517	91.3	3e-16	<i>Deltaproteobacteria</i>	Anaerobes, motile; couples the oxidation of organic molecules to the reduction of iron, can also use uranium and plutonium
Heparinase III					

续表 2

Organisms	Protein (Accession no.)	Score	E value	Classification	Comments
<i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076	YP_828663 YP_821339 YP_828360 YP_825291	179	6e-43	<i>Acidobacteria</i>	Aerobic,ubiquitous in soil ,large genome(10Mb)
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDgctg229	-	117	3e-24	<i>Firmicutes</i>	Anaerobes ,isolated from a forest soil ,important in anaerobic fermentation of cellulose
<i>Psychromonas ingrahamii</i> 37	YP_941892	95.1	2e-17	<i>Gammaproteobacteria</i>	Anaerobes ,psychrophile
<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	-	92.4	1e-16	<i>Deltaproteobacteria</i>	Aerobic myxobacteria, high GC content (67%) , large genome(10.2 Mb)
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	NC_008261	87.8	3e-15	<i>Firmicutes</i>	Anaerobes ,type strain of the species, human pathogen
<i>Streptococcus agalactiae</i> CJB111	-	80.5	5e-13	<i>Firmicutes</i>	Facultative anaerobes ,human pathogen
Heparinase from <i>Bacillus circulans</i> (BAB91369.)					
<i>Bacteroides caccae</i> ATCC 43185	-	287	3e-75	<i>Bacteroidetes</i>	Anaerobes ,normal resident of the healthy human gut microbiome,opportunistic pathogens
<i>Bacteroides uniformis</i> ATCC 8492	-	281	2e-73	<i>Bacteroidetes</i>	Anaerobes ,being sequenced as part of the human gut microbiome project
<i>Photobacterium profundum</i> SS9	NC_006371	211	4e-52	<i>Gammaproteobacteria</i>	Facultative, low temperature and high pressure adaptation, contains two chromosomes and one plasmid
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	207	3e-51	<i>Gammaproteobacteria</i>	Facultative, ubiquitous in the environment, food and waterborn pathogen

a) Four known heparinases sequences were blasted against bacterial and archaea genome database (789 genomes by March 27, 2007) using the tblastn program; b) Heparinase homolog from *Bacteroides thetaiotaomicron* has been validated very recently^[20]

2 肝素酶作用机理

到目前为止对肝素酶降解肝素和乙酰肝素机理的研究主要集中在肝素黄杆菌的三种肝素酶上,尤其以肝素酶 I、II 的研究最多。

肝素酶 I 的基因序列全长 1143 bp,编码 384 个氨基酸,其中 1 ~ 21 个氨基酸是肝素黄杆菌中分泌信号肽,含有常见的 Ala-X-Ala 结构^[21]。肝素酶 I 存在三个底物肝素结合位点和两个钙离子激活位点以及一个罕见的糖基化位点,糖基化与否对肝素酶 I 的酶活没有影响,其作用未知,猜测可能与该酶的稳定性有关^[22]。肝素酶 I 存在三个半胱氨酸,但没有二硫键形成,其中一个在信号肽,一个溶剂不可及,只有 Cys¹³⁵ 是溶剂可及的^[22,23]。化学修饰和定点突变的结果表明 Cys¹³⁵ 与肝素酶 I 的催化活性密切相关,将 Cys¹³⁵ 突变为丝氨酸和丙氨酸,其催化性能显著下降,说明 Cys¹³⁵ 可能位于肝素酶 I 的活性中心^[24]。研究还表明肝素酶 I 的 4 个组氨酸,其中 His²⁰³ 与肝素酶 I 的催化密切相关,可能也在活性中心^[25]。进一步研究发现,不仅是组氨酸,在肝素酶 I 的两个肝素结合位点中的氨基酸大多荷正电,而系统的定点突变的研究表明这些正电荷对维持肝素酶 I

的活性是必需的,尤其是 Lys¹⁹⁹。这可能是因为肝素分子荷负电,这些荷正电的氨基酸与肝素分子产生静电吸附^[26,27]。研究表明,在肝素酶 I 的纯化过程中加入钙离子有助于保持该酶的活力^[28]。通过化学修饰和定点突变研究,发现肝素酶 I 存在两个与钙离子激活相关的氨基酸序列 CB-1 和 CB-2。该序列和许多钙离子结合蛋白所共有的 EF-hand motif 有较高的类似性。CB-1 和 CB-2 都参与和钙离子的结合,但定点突变的结果显示,CB-2 在肝素酶 I 的催化中起到更重要的作用,特别是 CB-2 的最后几个氨基酸。虽然 CD 光谱的数据表明,存在钙离子与否对肝素酶的结构没有影响,但钙离子在肝素酶 I 的催化中可能起到 Lewis 酸的作用。因此肝素酶 I 与底物肝素结合和催化肝素裂解的相关结合位点和活性中心,涉及到的氨基酸包括 Cys¹³⁵, His²⁰³, Lys¹⁹⁹ 等^[27]。研究表明肝素酶 I 降解肝素分为两步骤^[29],首先肝素酶 I 在肝素分子的非还原性末端表现出外切酶的活性,然后朝向还原末端顺序降解同一肝素分子。但是关于肝素酶 I 的立体结构及其详细的酶作用机理至今还没有相关的研究报道。

化学修饰的结果和定点突变表明在肝素酶 II 的三个半胱氨酸中 Cys³⁴⁸ 是溶剂可及的,可能处于催化中

心,将 Cys³⁴⁸突变为丙氨酸,肝素酶 II 对肝素的酶活显著降低,而对硫酸乙酰肝素的酶活则无显著变化^[30]。化学修饰的结果还表明另两个半胱氨酸对酶活影响不大^[30]。肝素酶 II 有三个组氨酸是溶剂可及的,且对酶活影响很大,分别为 His²³⁸, His⁴⁵¹, His⁵⁷⁹^[31]。肝素酶 II 的结构最近由 McGill 大学的小组解析成功^[32]。肝素酶 II 以同源二聚体形式与底物肝素结合,但每个单体都形成独立的活性中心^[32]。每个单体由 N 端的 α -helix 域,中间的两层 β -sheet 域和 C 段的 β -sheet 域构成,属多糖裂解酶第八家族。肝素酶 II 的结构证实了先前化学修饰的结果^[30,31]。

3 肝素酶的表达及调控

尽管肝素酶的研究早在上世纪 80 年代就已开始,但是其调控机理至今仍然知之甚少。并且与大多数微生物酶不同的是,肝素黄杆菌表达的肝素酶 I,肝素酶 II 和硫酸软骨素酶 AC,硫酸软骨素酶 B 都被糖基化修饰^[21,33]。而在大肠杆菌中的重组表达结果表明,糖基化修饰与否并不影响肝素酶 I 的酶活^[21]。

研究表明,肝素酶 I 的启动和表达受肝素的诱导,并且受硫酸盐抑制。在葡萄糖培养基中,仅有极少量的基础表达,肝素酶 I 的表达量随诱导剂增加而增加,当用肝素作为唯一碳源时,其表达量达最大值。为进一步研究 *HepA* 启动子特性,Blain 等^[34]将 *HepA* 的启动子序列(830bp)和 *HepA*, *hepB*, *hepC*, *csIA*, *csIB* 基因融合,并通过接合将重组质粒导入肝素黄杆菌。在肝素作为底物的培养基下,其表达量比野生菌株分别提高 5、5、10、20、15 倍。引物延伸(primer extension)结果表明,*HepA* 的转录起点在起始密码 ATG 上游 26bp 处^[34]。但 *HepA* 上游序列如何提高其融合基因的表达量的机理至今并不清楚,需要进一步实验的探索。

4 肝素酶的重组表达研究

4.1 肝素黄杆菌肝素酶 I 的重组表达研究

肝素酶 I 通常是从肝素黄杆菌发酵液中提纯获得的,由于产量很低,需要价格昂贵的肝素的诱导,通常需要经过多步的色谱纯化,收率很低;肝素黄杆菌生产肝素酶 I 时同时产生肝素酶 II 和 III,使肝素酶 I 的分离纯化变得极为复杂。因为这些原因导致肝素酶 I 的价格十分昂贵。而且肝素黄杆菌同源表达肝素酶的载体的构建研究直到最近才有进展^[34,25],因此,肝素酶 I 的异源重组表达是替代肝素黄杆菌生产肝素酶 I 的有效

可行方案。

Sasisekharan 等^[23]首先克隆了不含信号肽的肝素酶 I 基因(*HepA*)并在大肠杆菌中重组表达。结果表明大肠杆菌能够表达肝素酶 I,但不能协助其正确折叠形成有活性的蛋白,需要通过复性才能获得有活性的肝素酶 I,而且复性效率很低^[23]。为提高肝素酶 I 在大肠杆菌中的表达量并实现分离纯化,Ernst 等^[36]将肝素酶 I 基因分别克隆到表达载体 pET12a, pET15b 和 pET28a 中, pET12a-*HepA* 和 pET28a-*HepA* 表达的肝素酶 I 是以包涵体的形式存在,而 pET15b-*HepA* 虽然能表达可溶肝素酶 I,但表达量极低(97.8 IU/L 发酵液)。尽管表达生成的包涵体蛋白通过复性后可获得具有活性的蛋白,但收率很低(43%)^[22]。

为提高肝素酶 I 在大肠杆菌中的表达水平,Shpigel 等^[37]将 *HepA* 与噬细胞梭菌(*Clostridium cellulovorans*)的纤维素结合蛋白 A 的纤维素结合域(cellulose binding domain)融合并克隆到载体 pET3d 中分别构建了 CBD-163-*HepA*, CBD-180-*HepA* 和 *HepA*-CBD 融合蛋白。在大肠杆菌中表达这三种融合蛋白都形成了无活性的包涵体,但通过复性可以获得肝素酶 I 的酶活。通过纤维素结合域可实现融合蛋白的亲分离^[37]。值得注意的是,融合表达策略对肝素酶 I 的活性的影响。CBD-163-*HepA* 与 CBD-180-*HepA* 融合蛋白的不同之处在于 CBD-180-*HepA* 融合蛋白在 CBD 与 *HepA* 之间存在一个天然的连接肽。加入了连接肽之后的融合蛋白 CBD-180-*HepA* 催化性能得到改善,尽管催化肝素裂解的初始速率相同,但 CBD-163-*HepA* 酶活很快被抑制。而 CBD 与 *HepA* 的 C 端和 N 端融合的比较发现,将肝素酶 I 的 C 端与 CBD 融合则酶活较低,这可能是由于肝素酶 I 的 C 端存在的钙离子激活位点被 CBD 阻挡或者是其高级结构发生变化。实验结果还发现, CBD 和肝素酶 I 融合后与纤维素的结合力下降,这也说明融合蛋白在与底物之间的结合和催化上存在空间的阻碍。

Sasisekharan^[22]还研究了肝素酶在大肠杆菌分泌表达的可能性,利用 OmpA 信号肽融合的肝素酶 I 表达系统以及利用肝素酶 I 自身的信号肽都不能有效实现肝素酶在大肠杆菌中的分泌表达。尽管在低温下诱导(23℃)可以通过免疫印迹(Western blot)检测到肝素酶 I 的表达,但蛋白表达量和酶活很低。笔者所在实验室也尝试利用麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)的信号肽协助肝素酶 I 在大肠杆菌中的分泌,但效果也不理想。Sasisekharan^[22]还研究了肝素酶 I 在链

霉菌中重组表达的可能性。尽管免疫印迹可以检测到肝素酶 I 的蛋白表达,但测不到酶活,原因未知^[22]。

针对肝素酶在大肠杆菌中表达极易形成无活性的包涵体的问题,笔者所在实验室提出利用新型融合载体提高肝素酶在大肠杆菌中重组表达的活性和可溶性。本实验实将 HepA 与 MBP 融合,同时在低温诱导(15~20℃),可以实现 90% 以上目标蛋白的可溶表达^[38]。通过进一步改进融合策略,并对发酵条件和培养基优化,利用含葡萄糖、酵母粉和钙离子的 M9 改良培养基在 5 L 发酵罐上培养和诱导,总酶活可达 20650 IU/L(表 3),极大地降低了肝素酶生产的成本^[39]。并且利用 MBP 与直链淀粉的亲吸附实现了肝素酶 I 的快速分离和纯化,一次亲和吸附后目标蛋白纯度可达

95%^[38~40]。利用 MBP 和麦芽糖的亲和吸附功能,可以实现 MBP-HepA 的分离纯化与定向固定化操作的一体化,有望大幅度降低酶的生产和使用成本。对该融合酶基本特性进行研究表明,其最适作用温度和 pH 分别为 30℃ 和 7.4,与肝素黄杆菌的天然肝素酶 I 一致。其降解肝素的动力学参数拟合表明该酶对肝素的降解符合米氏方程, $K_m = 85.3 \mu\text{M}$ ^[39]。纯化的融合肝素酶 I 能够对肝素进行有效的降解^[40]。笔者的研究还表明,利用绿色荧光蛋白(GFP)也能有效地提高肝素酶 I 在大肠杆菌中重组表达的可溶性^[41];并且 GFP 荧光量与肝素酶酶活之间存在简单的线性关系^[41],可实现发酵过程中酶活的快速定量检测,并为在 LMWH 生产过程中酶反应过程示踪打下了良好的基础。

表 3 肝素黄杆菌和重组大肠杆菌生产肝素酶 I 的比较
Table 3 Comparison of HepA production by recombinant *E. coli* and *F. heparinum*

Enzyme	Total enzyme activity(IU/L)	Optimum pH	K_m	Functional expression (Yes/No)	Reference
Native	624	7.15	17.8(μM)	Yes	[4]
rHepA	3898	-	47($\mu\text{g/ml}$) (native, 33 $\mu\text{g/ml}$)	No	[36]
CBD-HepA	10500	-	-	No	[37]
MBP-HepA	20650	7.5	85.3(μM)	Yes	[39]

4.2 其它微生物肝素酶的重组表达研究

除肝素黄杆菌肝素酶 I 基因外,仅有肝素黄杆菌肝素酶 II、肝素黄杆菌肝素酶 III 和环状芽孢杆菌肝素酶基因得到克隆和表达。运用和肝素酶 I 克隆类似的方法,Su 等^[42]和 Godavarti 等^[43]分别克隆肝素黄杆菌的肝素酶 II 和 III 基因 *hepB* 和 *hepC*,并在大肠杆菌中得到重组表达。结果表明,无信号肽的 *hepB* 和 *hepC* 都能在大肠杆菌中得到有活性的功能表达。肝素酶 II 在大肠杆菌中重组表达形成包涵体,包涵体的比例在 37~25℃ 范围内随温度的降低而减少。而肝素酶 III 在大肠杆菌中重组表达仅有 15% 左右目的蛋白以可溶形式存在,并且包涵体很难通过复性得到活性。

Yoshida 等^[6]通过简并引物扩增得到环状芽孢杆菌肝素酶基因,序列比对结果表明,环状芽孢杆菌的肝素酶的序列与肝素黄杆菌肝素酶 I、II、III 的相似性很小,而具有与透明质酸酶(AB028210)和硫酸软骨素裂解酶(L42367)高度同源的保守序列。重组肝素酶与野生菌生产的酶具有同样的最适作用温度和 pH,但在大肠杆菌中的重组表达易形成无活性的包涵体,只有在极低浓度 IPTG(0.05mmol/L)下诱导,才可得到可溶表达^[6]。

综上所述,肝素酶重组表达的主要问题之一是重组肝素酶在大肠杆菌中表达极易形成无活性的包涵体,而且很难通过复性获得有活性的蛋白,妨碍了肝素酶应用研究的进一步开展。然而利用和 MBP 或 GFP 融合的策略可以实现可溶表达,为肝素酶的规模化生产和应用提供了有效的途径^[38~41]。

5 肝素酶的应用

5.1 低分子肝素的生产

肝素用于治疗 and 预防血栓已经有很长的历史,但是研究表明肝素有一定的副作用,例如影响血小板的稳定导致手术后大出血。而分子量在 4000~8000(11~14 个单糖)的低分子肝素(LMWH)能够有效地治疗血栓但是没有明显的副作用。目前为止,低分子量肝素已逐步取代肝素成为首选药。

LMWH 的生产通常有两种方法,化学裂解法和酶法^[44,45]。与化学方法比较,酶法的作用比较温和,环境友好,并且不会作用于硫酸基团,是理想的工业生产方法。酶法生产 LMWH 的瓶颈在于:(1)成本过高,尤其是肝素酶的来源受到限制,野生菌产量极低且需要价格昂贵的肝素诱导^[2~4]。而另一方面肝素酶的重组表

达易形成无活性的包涵体,而且不易复性^[22,23]。(2)微生物来源的肝素酶是裂解酶,其裂解反应所产生的 LMWH 非还原末端产生不饱和键影响其药效,需要通过臭氧氧化去除该不饱和键^[46]。我国是肝素原料的出口大国,但是 LMWH 的生产技术一直缺乏系统的研究。目前 LMWH 需要依靠进口或者来自合资企业生产,因此 LMWH 的酶法生产研究具有重要的工业应用前景。

针对以上问题,笔者所在实验室构建了高效表达可溶肝素酶的重组大肠杆菌系统,极大降低了肝素酶的生产成本,使得肝素酶用于 LMWH 的生产成为可能^[38,39];并且,初步的实验结果表明该系统所表达的肝素酶融合蛋白能够有效降解高分子肝素生产可控分子量的 LMWH 和超低分子量肝素(uLMWH)^[40]。

5.2 体外血液循环中肝素的消除

某些重症病人例如尿毒症患者在手术过程中需要进行血液的体外循环,在体外循环的过程中为防止血液凝固需要加入肝素。为防止肝素残存在血液中影响血液凝固,临床上加入肝素,手术结束后需要加入肝素酶将肝素降解。由于肝素酶对细胞外基质也有降解作用,因此用于血液肝素化去除的肝素酶需要进行固定化^[47],并且要求肝素酶不能有免疫原性。IBEX(www.ibex.ca)公司商品化的肝素酶 I(Neutralase™)用于体外循环中肝素的去除,已进入临床三期试验,尽管最新研究否定了肝素酶 I 用于体外循环的安全性,其用于该领域的研究值得进一步深入探讨^[48]。易于分离和固定化的 MBP-HepA 融合蛋白技术为相关研究的发展提供可靠的保障。

5.3 其它

肝素酶作为能降解复杂多糖的工具酶之一,可用于肝素多糖及寡糖结构研究。由于构成多糖的单糖结构的复杂性,多糖类物质的化学结构及成份分析仍然是糖生物化学中的难题之一。肝素酶作为工具酶可以降解肝素形成低分子糖单元,用于肝素及类肝素类多糖的结构分析以及制备肝素寡糖文库^[49]。肝素酶其它用途还包括:用于血液和血浆制品 PCR 反应的添加剂;可抑制新生血管的生成,可能用于肿瘤的治疗^[50]等。

6 展 望

肝素酶具有重要的用途,尤其在 LMWH 的生产和作为肝素体外循环中的肝素的去除。肝素酶的研究在我国起步相对较晚,到目前为止研究开展也并不系统深入。由于肝素酶昂贵的价格,其结构的研究及在低

分子量肝素的生产中的应用受到限制。利用基因工程方法开发成功的肝素酶功能表达技术将会促进肝素酶研究的进一步开展^[37~40],特别是利用 MBP 和 GFP 的融合蛋白表达策略,不仅可以实现肝素酶的可溶表达,而且还有利于酶的分离纯化和固定化以及快速定量检测,对肝素酶的研究和应用发展将产生积极的推动作用。笔者认为肝素酶的后续研究应主要集中在以下几方面:(1)新型肝素酶生产菌和基因的筛选以及肝素酶的分子酶工程研究。酶活高、稳定性好、耐酸碱的肝素酶的研发将有助于提高酶反应器的效率。环境基因组(metagenomics)的应用将为肝素酶的筛选提供一种有效的手段^[51]。(2)对肝素酶与底物肝素相互作用的解析。由于肝素酶 II 结构的成功解析,将有助于进一步阐述肝素酶如何与底物肝素产生作用。与此同时,由于肝素酶 I 的立体结构至今未知,其解析也应受到重视。(3)开发适合于工业生产的高效反应器用于 LMWH 的生产。我国是肝素生产大国,LMWH 具有巨大市场,而传统化学方法的污染问题严重,生产的 LMWH 药效较低,酶法生产是一条有效的途径。因此用于 LMWH 生产的酶反应器的开发将十分重要。(4)进一步研究和开发肝素酶在医药上的用途。尽管肝素黄杆菌肝素酶 I 用于体外循环中肝素去除的安全性受到质疑^[48],新型肝素酶的开发可能有助于此问题的解决。另外肝素酶在抑制肿瘤细胞转移和扩散上的潜在应用也值得进一步探索^[50]。

参考文献

- [1] Payza A N, Korn E D. Bacterial degradation of heparin. *Nature*, 1956, 177(4498): 88 ~ 89
- [2] 马小来, 袁勤生. 微生物肝素酶研究进展. *中国医药工业杂志*, 2005, 36(2): 119 ~ 122
Ma X, Yuan Q. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2005, 36(2): 119 ~ 122
- [3] Bohmer L H, Pitout M J, Steyn P L, et al. Purification and characterization of a novel heparinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(23): 13609 ~ 13617
- [4] Lohse D L, Linhardt R J. Purification and characterization of heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(34): 24347 ~ 24355
- [5] Yoshida E, Sakai K, Tokuyama S, et al. Purification and characterization of heparinase that degrades both heparin and heparan from *Bacillus circulans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 6: 1181 ~ 1184

- [6] 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. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 66(9): 1873 ~ 1879
- [7] Ahn M Y, Shin K H, Kim D H, et al. Characterization of a *Bacteroides* species from human intestine that degrades glycosaminoglycans. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, 44(5): 423 ~ 429
- [8] Kim B T, Kim W S, Kim Y S, et al. Purification and characterization of a novel heparinase from *Bacteroides Stercoris* HJ-15. *Journal of Biochemistry*, 2000, 128(2): 323 ~ 328
- [9] Kim B T, Hong S W, Kim W S, et al. Purification and characterization of acharan sulfate lyases, two novel heparinases, from *Bacteroides stercoris* HJ - 15. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(9): 2635 ~ 2641
- [10] Hong S W, Shin H Y, Kim Y S, et al. Purification and characterization of novel salt-active acharan sulfate lyase from *Bacteroides stercoris* HJ-15. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(15): 3168 ~ 3173
- [11] Kim W S, Kim B T, Kim D H, et al. Purification and characterization of heparin lyase I from *Bacteroides stercoris* HJ-15. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 37(6): 684 ~ 690
- [12] 高宁国, 程秀兰, 杨敬, 等. 鞘氨醇杆菌肝素酶的产生. *微生物学报*, 2003, 43(6): 813 ~ 816
Gao N G, Cheng X L, Yang J, et al. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(6): 813 ~ 816
- [13] Chao Y P, Gao N G, Cheng X L, et al. Rapid purification, characterization and substrate specificity of heparinase from a novel species of *Sphingobacterium*. *Journal of Biochemistry*, 2003, 134(3): 365 ~ 371
- [14] Nakamura T, Shibata Y, Fujimura S. Purification and properties of *Bacteroides heparinolyticus* heparinase (heparin lyase, EC 4. 2. 2. 7). *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26(5): 1070 ~ 1071
- [15] Watanabe M, Tsuda H, Yamada S, et al. Characterization of heparinase from an oral bacterium *Prevotella heparinolytica*. *Journal of Biochemistry*, 1998, 123(2): 283 ~ 288
- [16] 罗璠, 王忠彦, 胡承, 等. 肝素酶产生菌的筛选及其粗酶性质的研究. *四川大学学报*, 2002, 39(4): 777 ~ 779
Luo F, Wang Z Y, Hu C, et al. *Journal of Sichuan University*, 2002, 39(4): 777 ~ 779
- [17] 高宁国, 程秀兰, 杨敬, 等. 肝素酶产生菌的筛选及发酵条件. *微生物学报*, 1999, 39(1): 64 ~ 67
Gao N G, Cheng X L, Yang J, et al. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(1): 64 ~ 67
- [18] Steyn P L, Segers P, Vancanneyt M, et al. Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. proposal of the family Sphingobacteriaceae fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48: 165 ~ 177
- [19] Shivaji S, Chaturvedi P, Reddy G S N, et al. *Pedobacter himalayensis* sp. nov., from the Hamta glacier located in the Himalayan mountain ranges of India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 1083 ~ 1088
- [20] Luo Y, Huang X, McKeehan W L. High yield, purity and activity of soluble recombinant *Bacteroides thetaiotaomicron* GST-heparinase I from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 460(1): 17 ~ 24
- [21] Godavarti R, Sasisekharan R. A comparative analysis of the primary sequences and characteristics of heparinases I, II, and III from *Flavobacterium heparinum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 229(3): 770 ~ 777
- [22] Sasisekharan R. Cloning and characterization of heparinase I from *Flavobacterium heparinum*. [Ph. D. thesis]: Harvard University, 1991
- [23] Sasisekharan R, Bulmer M, Moremen KW, et al. Cloning and expression of heparinase I gene from *Flavobacterium heparinum*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(8): 3660 ~ 3664
- [24] Sasisekharan R, Deborah L, Godavarti R, et al. Heparinase I from *Flavobacterium heparinum*; the role of the cysteine residue in catalysis as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 1995, 34(44): 14441 ~ 14448
- [25] Ranga G, Charles L C, Langer R, et al. Heparinase I from *Flavobacterium heparinum*; identification of a critical histidine residue essential for catalysis as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 1996, 35(21): 6846 ~ 6852
- [26] Ranga G, Sasisekharan R. Heparinase I from *Flavobacterium heparinum*; role of positive charge in enzymatic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(1): 248 ~ 255
- [27] Sasisekharan R, Ganesh V, Godavarti R, et al. Heparinase I from *Flavobacterium heparinum*; mapping and characterization of the heparin binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 3214 ~ 3131
- [28] Ma X L, Wang Z S, Li S X, et al. Effect of CaCl₂ as activity stabilizer on purification of heparinase I from *Flavobacterium heparinum*. *Journal of Chromatograph B*, 2006, 843: 209 ~ 215
- [29] Ernst S, Rhomberg A J, Biemann K, et al. Direct evidence for a

- predominantly exolytic processive mechanism for depolymerization of heparin - like glycosaminoglycans by heparinase I. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95: 4182 ~ 4187
- [30] Zachary S, Yini H, Sasisekharan R. Heparinase II from *Flavobacterium heparinum*; role of cysteine in enzymatic activity as probed by chemical modification and site - directed mutagenesis. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273 (36) : 22904 ~ 22912
- [31] Zachary S, Yini H, Sasisekharan R. Heparinase II from *Flavobacterium heparinum*; role of histidine in enzymatic activity as probed by chemical modification and site - directed mutagenesis. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273 (36) : 10160 ~ 10167
- [32] Shaya D, Tocilj A, Li Y, et al. Crystal structure of heparinase II from *Pedobacter heparinus* and its complex with a disaccharide product. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281 (22) : 15525 ~ 15535
- [33] Pojasek K, Shriver Z, Kiley P, et al. Recombinant expression, purification, and kinetic characterization of chondroitinase AC and chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 286 (2) : 343 ~ 351
- [34] Blain F, Tkalec A L, Shao Z, et al. Expression system for high levels of GAG lyase gene expression and study of the hepA upstream region in *Flavobacterium heparinum*. Journal of Bacteriology, 2002, 184 (12) : 3242 ~ 3252
- [35] Su H, Shao Z, Tkalec A L, et al. Development of a genetic system for the transfer of DNA into *Flavobacterium heparinum*. Microbiology, 2001, 147: 581 ~ 589
- [36] Ernst S, Venkataraman G, Winkler S, et al. Expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of heparinase I from *Flavobacterium heparinum*. Biochemical Journal, 1996, 315: 589 ~ 597
- [37] Shpigel E, Goldlust A, Efroni G, et al. Immobilization of recombinant heparinase I fused to cellulose -binding domain. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 65 (1) : 17 ~ 23
- [38] Chen Y, Xing X H, Lou K. Construction of recombinant *Escherichia coli* for over-production of soluble heparinase I by fusion to maltose -binding protein. Biochemical Engineering Journal, 2005, 23: 155 ~ 159
- [39] Chen Y, Xing X H, Ye F C et al. Production of MBP - HepA fusion protein in recombinant *Escherichia coli* by optimization of culture medium. Biochemical Engineering Journal, 2007, 34: 114 ~ 121
- [40] Kuang Y, Xing X H, Chen Y, et al. Production of heparin oligosaccharides by fusion protein of MBP - heparinase I and the enzymatic thermostability. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 43: 90 ~ 95
- [41] Chen Y, Xing X H, Ye F C, et al. Soluble expression and rapid quantification of GFP - HepA fusion protein in recombinant *Escherichia coli*. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2007, 15 (1) : 122 ~ 126
- [42] Su H, Blain F, Musil R A, et al. Isolation and expression in *Escherichia coli* of *hepB* and *hepC*, genes coding for the glycosaminoglycan - degrading enzymes heparinase II and heparinase III, respectively, from *Flavobacterium heparinum*. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62 (8) : 2723 ~ 2734
- [43] Godavarti R, Davis M, Venkataraman G, et al. Heparinase III from *Flavobacterium heparinum*; cloning and recombinant expression in *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 225 (3) : 751 ~ 758
- [44] 石峰, 姬胜利, 迟延青, 等. 低分子肝素的制备方法及其结构与生物活性的关系. 中国生化药物杂志, 2003, 24 (2) : 101 ~ 104
- Shi F, Ji S L, Chi Y Q, et al. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2003, 24 (2) : 101 ~ 104
- [45] Linhardt R J, Gunay A N S. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 1999, 25 (3) : 5 ~ 16
- [46] Linhardt R T. Chemical and enzymatic methods for the depolymerization and modification of heparin. (In) Ogura H, Hasegawa A and Suami T. Carbohydrates - Synthetic Methods And Applications In Medicinal Chemistry. Kodansha (Tokyo) and Wiley-VCH (New York) , 1992, 385 ~ 401
- [47] Linhardt R J, Cooney C L, Tapper D, et al. An immobilized microbial heparinase for blood deheparinization. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1984, 9: 41 ~ 45
- [48] Stafford-Smith M, Lefrak E A, Qazi A G, et al. Efficacy and safety of heparinase I versus protamine in patients undergoing coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. Anesthesiology, 2005, 103 (2) : 229 ~ 240
- [49] Venkataraman G, Shriver Z, Raman R, et al. Sequencing complex polysaccharides. *Science*, 1999, 286: 537 ~ 542
- [50] Sasisekharan R, Moses M A, Nugent M A, et al. Heparinase inhibits neovascularization. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91 (4) : 1524 ~ 1528
- [51] Cowan D, Meyer Q, Stafford W, et al. Metagenomic gene discovery: past, present and future. Trends in Biotechnology, 2005, 23 (6) : 321 ~ 329

Progress in the Study of Heparinases

CHEN Yin YE Feng-chun KUANG Ying XING Xin-hui

(Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Heparinases, a kind of polysaccharide lyases, can degrade heparin and heparin sulfate to low molecular weight polysaccharides. It has been noted that many bacteria have heparinases although only few of them have been purified and characterized. Heparinases I, II and III from *Flavobacterium heparinum* have been extensively studied for many years and been commercialized recently. Heparinases have some important applications in the industry and clinic as well as in the determination of heparin structure, which is a very important anticoagulant drug used world -widely. The recent progresses in isolation of heparinase -producing bacteria, genome mapping of heparinase homologs in sequenced bacteria and archaea genomes, purification of heparinases and the study of their biochemistry and regulation were reviewed. The recombinant expression of these enzymes as well as important applications of heparinases and their potential applications in the future will also be highlighted.

Key words Heparinase Heparin Purification Recombinant expression Application