

温和气单孢菌 YH311 硫酸软骨素裂解酶的分离纯化与固定化

蔡苏兰 阎浩林* 何汉洲

(沈阳药科大学制药工程学院 沈阳 110016)

摘 要 通过硫酸铵沉淀、QAE-Sephadex A50 柱层析及 Sephadex G-150 凝胶过滤等纯化步骤,对源自温和气单孢菌 YH311 的 ChSase 进行了分离纯化。结果表明,ChSase 经上述纯化步骤后被纯化了 55 倍,其最终纯度可达 95% 以上,比活为 31.86u/mg。经 SDS-PAGE 及 IFE 测定可知该酶的分子量约为 80kD,等电点为 4.3~4.8。将纯化后的 ChSase 用海藻酸钠或纤维素固定化后,ChSase 的热稳定性及贮存稳定性均可得到大幅度的提高;固定化酶用 80℃ 水浴处理 120min 或于 4℃ 冰箱放置 30d 后仍可保留 50% 以上的相对活力;但固定化酶的收率较低,仅为 18.56% 和 18.86%。

关键词 硫酸软骨素裂解酶 分离纯化 固定化酶 海藻酸钠 纤维素

中图分类号 Q815 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)04-0584-06

硫酸软骨素裂解酶(chondroitinase 或 chondroitin sulfate lysase 简称 ChSase)是一类能将硫酸软骨素、软骨素、透明质酸等糖胺聚糖降解为不饱和二糖(Δ Di)及寡糖的裂解酶。随着对 ChSase 的深入研究,人们已发现 ChSase 不仅可用于了解硫酸软骨素在机体内的分布、结构与功能^[1-3],而且 ChSase 有着广泛的药理学活性:ChSase 可溶解椎间盘内髓核或破裂的纤维环、降解囊性纤维变性部位的黏液物、阻止玻璃体与视网膜的粘连、促进神经轴的再生、抗肿瘤以及增强软骨细胞与软骨的黏附能力等^[4-9]。此外,由于低分子量硫酸软骨素(2kD~10kD)对于预防动脉粥样硬化、风湿性关节炎和伤口愈合具有更好的疗效^[10],因此酶解法制备低分子量硫酸软骨素也是目前研究的热点之一。在国外,对于 ChSase 的研究比较早,商品化的 ChSase ABC、ChSase AC 等多由 *Proteus vulgaris* 及 *Flavobacterium heparinum* 两种菌株生产,其价格昂贵并且其生产受专利保护^[11];而国内对于 ChSase 的研究较少,仅林雪松等报道过用普通变形杆菌 6010 制备 ChSase^[12]。我们利用本实验室筛选出的一株产 ChSase 的温和气单孢菌 YH311[*Aeromonas sobria* YH 311]通过硫酸铵沉淀、QAE-Sephadex A50 阴离子交换柱层析及凝胶过滤层析等步骤分离纯化出了 ChSase(其类型尚未确定)经

测定该 ChSase 的分子量为 80kD,等电点为 4.3~4.8。

固定化酶技术是 20 世纪 60 年代初期发展起来的一项新技术,以其操作简便、稳定性强、易与产物分开等优点而被广泛应用。在国内外,除 Nobuyuki Sato 等人报道过将 *Proteus vulgaris* NCTC4636 包埋于卡拉胶网格中外^[13],迄今尚无人利用固定化 ChSase 的方法进行降解硫酸软骨素的研究。实验中我们将纯化的 ChSase 分别通过海藻酸钠凝胶包埋法及纤维素共价结合法进行了固定化,经固定化后 ChSase 的稳定性得到了大幅度的提高。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 温和气单孢菌 [*Aeromonas sobria* YH 311],本实验室自行筛选。

培养基 斜面培养基:2% 营养肉汤 + 0.2% 硫酸软骨素 + 2% 琼脂;种子培养基:2% 营养肉汤 + 0.2% 硫酸软骨素;发酵培养基:4.5% 葡萄糖 + 2.0% 蛋白胨 + 0.1% 酵母粉 + 0.1% NaCl + 0.5% 硫酸软骨素。

主要试剂 硫酸软骨素 AC 混合物,购自宁波市中药制药厂;Sephadex G-150 为 Pharmacia 进口分装;QAE-Sephadex A50 购自中国医药集团上海化学试

剂公司;蛋白质分子量标准来自中国生物制品检定所;两性电解质为 Pharmacia 产品;对苯二胺购自中国医药集团上海化学试剂公司;海藻酸钠购自中国医药集团上海化学试剂公司;其它试剂均为进口或国产分析纯。

主要仪器:UV-9100 紫外可见分光光度计为北京瑞利仪器分析公司产品;电泳仪为北京六一仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 ChSase 的制备:参照 Manabu K 等^[14]的分离纯化方法并略有改动。取活化的试管斜面菌株接种于种子培养基(20mL 种子培养液/250mL 三角瓶)中,30℃、80r/min 条件下振荡通气培养 14h 后按 2% 接种量接种到发酵培养基(20mL 发酵液/250mL 三角瓶)中,30℃、80r/min 条件下振荡通气培养 24h 后将发酵液离心(10 000r/min,10 min),弃去菌体收集上清液 1100mL,然后将上清液用 75% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀过夜后离心(10 000r/min,10 min),取沉淀用 50mL 0.02mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.0)溶解并用 0.02 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.0)透析除盐,将所得的 70 mL 样品上样于 QAE-Sephadex A50 柱(2.6cm × 40cm),此时 ChSase 被吸附在层析柱上,然后用 0.02 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.0)进行洗脱(流速为 1mL/min,每管收集 3mL),直至无蛋白质洗出为止,然后换用含有 0.0~0.8 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.0)进行梯度洗脱,将活性组分合并后,用 Millipore 超滤离心管(截留分子量 50kD)离心浓缩成 2.0mL,将其中的 0.5 mL 上样于 Sephadex G-150 柱(2.0cm × 100cm),用含 0.1 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)进行洗脱(流速为 1mL/7min,每管收集 4 mL),收集活性组分。再将剩余的 1.5 mL 蛋白质浓缩液分次上样于 Sephadex G-150 柱(2.0cm × 100cm),最后将所有的活性组分浓缩备用。

1.2.2 蛋白质含量的测定:采用 Lowry 法^[15]。

1.2.3 蛋白质分子量、等电点的测定及纯度的鉴定:采用 SDS-PAGE 法及等电聚焦电泳法^[16]。

1.2.4 ChSase 的固定化:

(1)海藻酸钠凝胶包埋法:配置一定浓度的海藻酸钠凝胶溶液与酶液混合均匀,然后用注射器针筒滴入无菌的 0.2mol/L CaCl_2 溶液中,固化 20h,制成直径为 3~4mm 的球状固定化酶,最后用蒸馏水洗涤数次以除去未被包埋的酶。

(2)纤维素共价结合法:按文献[17]中方法进行

固定化。首先制备胺化纤维素,即将滤纸纤维素用 3mol/L NaOH 浸泡过夜,然后水洗,打浆,得到较均匀的纤维素。将 100g 湿纤维素悬浮于 150mL 1mol/L NaOH 溶液中,加入 60mL 环氧氯丙烷,于 60℃反应 30min,过滤,水洗后,再加入 20g 对苯二胺水溶液,于 45℃反应 30 min,抽干,水洗后即得胺化纤维素。然后进行固定化,其方法为:将 1g 载体加入水 3.0mL,再加入 1mol/L HCl 5.0mL 搅拌均匀。在 0~5℃下慢慢滴加 5.0mL 5% 的 NaNO_2 溶液。20min 后抽干。先用冷的 0.05mol/L HCl 洗 3 次,再用水洗 3 次后抽干。在磷酸缓冲液中(pH 6.0),加入一定量的 ChSase,在 0~5℃条件下反应 3h 后用水洗 3 次,即得固定化酶。

1.2.5 ChSase 活力的测定:

(1)溶液酶活力的测定:取溶液酶 10 μL 加入 4mL 0.2% 硫酸软骨素溶液(溶于 0.02 mol/L 磷酸缓冲液中,pH 7.5),37℃水浴中保温 20min 后于沸水浴中煮沸 2min,产物于 235nm 处测定不饱和二糖的吸光度 A 。

(2)固定化酶活力的测定:取海藻酸钠包埋的固定化酶 1g 或纤维素共价结合的固定化酶 0.1g 加入 5mL 0.2% 硫酸软骨素溶液(溶于 0.02 mol/L Tris-HCl 或磷酸缓冲液中,pH 7.5),37℃水浴中保温 20min 后,过滤取反应液于 235nm 处测定不饱和二糖的吸光度 A 。

(3)酶活力单位定义:参考 Yamagata T 等^[18]的方法,规定酶活力单位为在上述条件下每分钟裂解硫酸软骨素生成 1 μmol 不饱和二糖的酶量为一个活力单位。

(4)相对活力:在比较范围内固定化酶或溶液酶与相应的最高酶活力的比值(通常以百分数表示)。

2 结果与讨论

2.1 ChSase 的分离纯化

ChSase 经 QAE-Sephadex A50 柱层析及 Sephadex G-150 凝胶过滤层析的层析图谱见图 1 和图 2,分离纯化的具体结果见表 1。由图 1、图 2 及表 1 可知,ChSase 经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、QAE-Sephadex A50 柱层析和 Sephadex G-150 凝胶过滤层析等一系列纯化步骤后,其比活力可达 31u/mg、纯化收率可达 37%、最终可纯化 55 倍。纯化后的 ChSase 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法及等电聚焦电泳法检测其纯度时(见图 3、图 4)可得到单一的蛋白质条带,经薄层扫描可知其纯度为 95.3%,而且通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶

电泳可知该 ChSase 的分子量约为 80kD ,通过等电聚焦电泳可知该 ChSase 的等电点在 4.3 ~ 4.8 范围内。从分子量上看该 ChSase 的分子大小与文献中报道的 *Arthrobacter aureescens*、*Aeromonas liquefaciens* 及 *Fla-*

vobacterium heparinum 所产生的 ChSase AC 相似^[14 ,19 ,20] ,但等电点远远低于上述菌体产生的 ChSase AC ,因此该菌株产生的 ChSase 可能是一种新的 ChSase。

表 1 ChSase 的纯化

Table 1 Purification of chondroitinase from <i>Aeromonas sobria</i> YH311					
Purification step	Total activity/u	Total protein/mg	Yield/%	Specific activity[u/(mg·min)]	Purification(fold)
Crude extract	1792	3132.50	100.00	0.57	1.00
Ammonium sulfate , after dialysis	1061	213.12	63.39	4.98	8.73
QAE-sephadex A50 column	715	36.44	39.84	19.62	34.43
Sephadex G-150 column	651	20.43	37.39	31.86	55.89

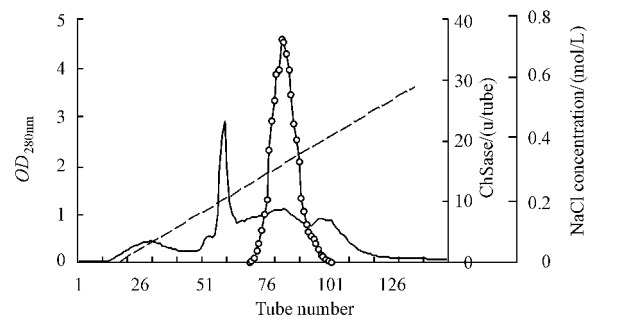


图 1 ChSase 经 QAE-Sephadex A50 柱的洗脱图

Fig.1 Elution pattern of chondroitinase from QAE-Sephadex A50 column —protein content in optical density at 280nm ; --- concentration of NaCl ○—enzyme activity ; A 3mL of fraction was collected in each tube

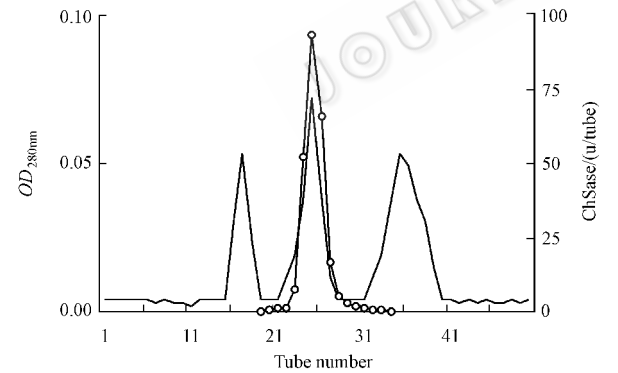


图 2 ChSase 经 Sephadex G-150 柱的洗脱图

Fig.2 Elution pattern of chondroitinase from Sephadex G-150 column ○—enzyme activity ; —protein content in optical density at 280nm ; A 4mL of fraction was collected in each tube

2.2 ChSase 的固定化

2.2.1 海藻酸钠凝胶包埋法固定化 ChSase 条件的确立：

(1)海藻酸钠浓度对酶固定化作用的影响 :取用不同浓度海藻酸钠凝胶(1.5% ~ 3.0% W/V)固定的硫酸软骨素裂解酶各 1g 测定酶活。结果见表 2。

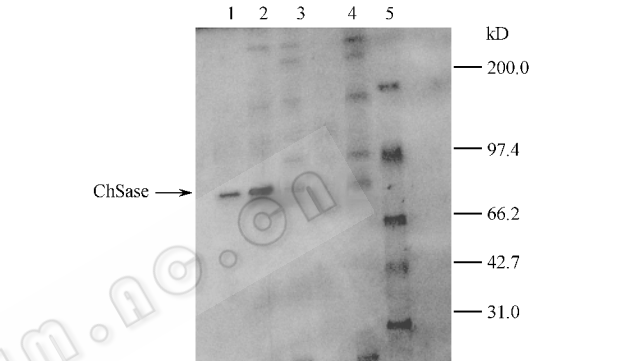


图 3 不同纯化阶段所获 ChSase 样品的 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE of chondroitinase samples obtained at different stages during purification 1 :after Sephadex G-150 ; 2 :after QAE-Sephadex A50 3 :crude extract 4 : after ammonium sulfate precipitate 5 :marker

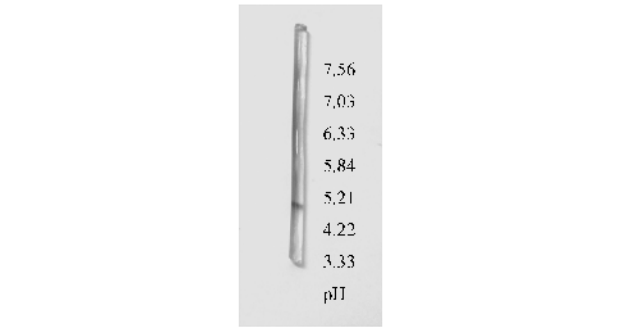


图 4 ChSase 的等电聚焦电泳图

Fig. 4 Isoelectric focusing gel electrophoresis of chondroitinase

表 2 海藻酸钠浓度对固定化酶活力的影响

Table 2 Effect of sodium alginate concentration on activity of immobilized chondroitinase

Concentration of sodium alginate/%	Absorption of unsaturated disaccharide (235nm)	Yield of activity/%
1.5	0.301	7.50
2.0	0.310	7.72
2.5	0.775	19.32
3.0	0.128	3.20

由表 2 可知 :当海藻酸钠凝胶浓度较低时 (1.5% ~ 2.0%) ,固定化酶颗粒的结构不够紧密 ,易造成 ChSase 从固定化酶颗粒中渗漏出来 ,致使部分酶分子丧失 ,从而造成固定化酶的活力及酶活回收率均较低 ;当海藻酸钠浓度过高时 (3.0%) ,固定化酶颗粒结构过于紧密 ,这样也不利于高分子底物与酶分子的接触 ,同样导致固定化酶的活力及酶活回收率较低 ;当海藻酸钠浓度为 2.5% 时 ,固定化酶颗粒的紧密程度既有利于对硫酸软骨素裂解酶的包埋 ,又有利于酶分子与高分子底物的接触 ,因此 ,其酶活力最大 ,酶活回收率达 19% 左右。此外 ,通过对固定化酶颗粒进行振荡测试 ,发现该浓度下的固定化酶颗粒的机械强度也较好。因此 ,在本实验条件下 ,选用 2.5% 浓度的海藻酸钠凝胶对酶进行固定化。

(2) 给酶量对酶固定化活力的影响 :

用浓度为 2.5% 的海藻酸钠包埋不同量的 ChSase (4% ~ 20% V/V) ,然后各取固定化酶 1g 测酶活。结果见图 5。

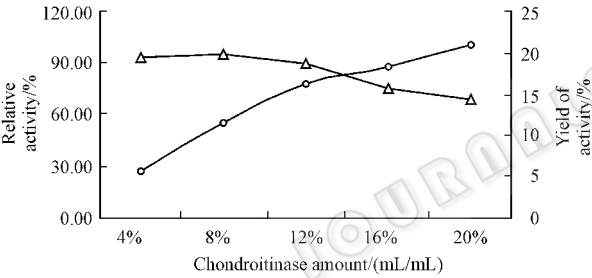


图 5 给酶量对固定化酶活力的影响

Fig. 5 Effect of added chondroitinase amount on activity of immobilized chondroitinase
—○—relative activity ; —△—yield of activity

由图 5 可知 ,当用浓度为 2.5% 的海藻酸钠凝胶包埋不同量的酶液时 ,通过增加给酶量 ,可使单位体积内的固定化酶颗粒中所包埋的酶分子数增加 ,进而使固定化酶的活力增强。而与此同时 ,由于底物分子的分子量较大 ,尽管单位体积的固定化酶颗粒上的酶分子数大大增加了 ,也不能在更大程度上增加酶分子与底物分子的有效接触率 ,这样就造成了固定化酶的酶活回收率的降低。为了更好地转化底物分子 ,同时又不至于对酶的使用造成浪费 ,本实验条件下所选择的给酶量为 12% ,此时固定化酶的收率为 18.56%。

2.2.2 纤维素共价结合法固定化 ChSase 中给酶量对固定化酶活力的影响 :图 6 为固定化酶反应给酶量与固定化酶活力的关系。固定化酶活力并不随着

固定化反应给酶量的增加而提高。这可能是由于随着纤维素载体负载酶量的增大 ,酶分子相互拥挤造成的空间位阻增大。给酶量为 0.4mL/g 载体时纤维素共价结合法固定化 ChSase 最适 ,此时固定化酶的收率为 18.86%。

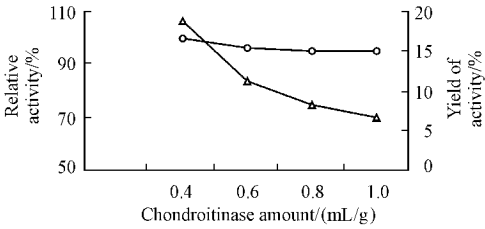


图 6 给酶量对固定化酶活力的影响

Fig. 6 Effect of added chondroitinase amount on activity of immobilized chondroitinase
—○—relative activity ; —△—yield of activity

2.2.3 固定化酶的性质 :

(1) 最适 pH :图 7 为在不同 pH 值下测定的溶液酶和固定化酶的活力。根据测定结果 ,溶液酶与经海藻酸钠凝胶包埋的 ChSase 的最适 pH 值均为 7.0 ,并且酶经海藻酸钠凝胶包埋后其曲线走向较为平缓 ,说明经海藻酸钠固定化后的酶受环境 pH 值的影响要小于原酶受环境 pH 值的影响 ;而酶用纤维素固定化后其活性受环境 pH 值的影响较大 ,其最适反应 pH 值向酸性范围内移动了 1 个单位。

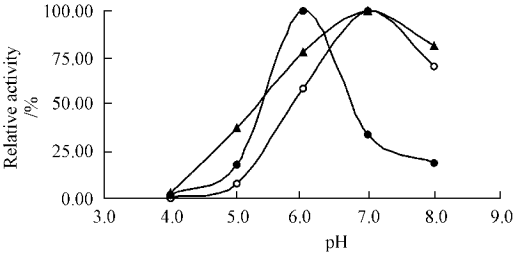


图 7 pH 值对 ChSase 活力的影响

Fig. 7 Effect of pH on chondroitinase activity
—○—free chondroitinase
—●—immobilized chondroitinase with cellulose
—▲—immobilized chondroitinase with sodium alginate

(2) 最适温度 :图 8 为在不同温度下测定的溶液酶和固定化酶的活力。根据测定结果 ,温度对固定化酶的影响较大。其中溶液酶的最适反应温度为 50℃ ,经海藻酸钠凝胶包埋后的 ChSase 的最适反应温度为 40℃ ,经纤维素共价结合后的 ChSase 的最适反应温度为 70℃。

(3) 热稳定性 :平行取海藻酸钠凝胶包埋的固定化酶 1g ,纤维素共价结合的固定化酶 0.1g 及原酶液 10μL 各 7 份 ,置于 80℃ 水浴中 ,每隔 20min 取出

一份测定酶活(持续 120min)。结果见图 9。原酶的热稳定性很低,当处理 20min 后酶活仅为最初活力的 10%,固定化酶经 120min 的长时间处理始终维持在 50% 以上且经纤维素共价结合的固定化酶的热稳定性更强,经 120min 处理后可保留近 70% 的活力。这说明 ChSase 经固定化后其结构得到了较好的稳定,对热具有较好的耐受能力。

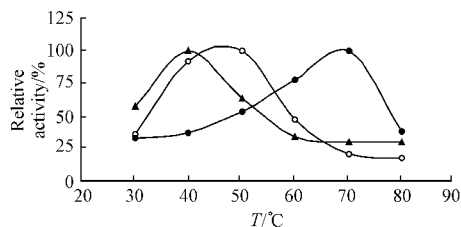


图 8 反应温度对 ChSase 活力的影响

Fig. 8 Effect of temperature on chondroitinase activity

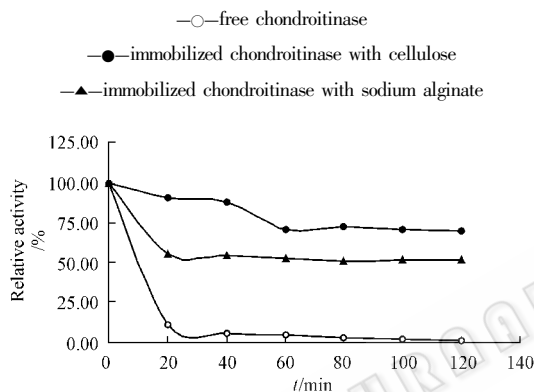


图 9 ChSase 的热稳定性

Fig. 9 Thermal stability of chondroitinase activity

(4) 贮存稳定性 隔日测定在 4℃ 冰箱中保存的溶液酶及两种固定化酶的活力单位,发现原酶活力单位于 2 周后降为 47%,即溶液酶的半衰期不到 14d,而经海藻酸钠凝胶固定化后的酶活力于 30d 后为 52%,即海藻酸钠固定化酶的半衰期达 30d 以上;经纤维素共价结合的 ChSase 的活力经 30d 仍为 85%,说明用纤维素共价结合的 ChSase 的半衰期远远高于 30d。

REFERENCES (参考文献)

[1] Sugahara K, Ohi Y, Harada T. Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage: I six compounds containing 0 or 1 sulfate and/or phosphate residue. *J Biol Chem*, 1992, **267**(9): 6027 - 6035

[2] Shibata S, Midura RJ, Hascall UC. Structural analysis of the linkage

region oligosaccharides and unsaturated disaccharides from chondroitin sulfate using Carbowax PA. *J Biol Chem*, 1992, **267**(10): 6548 - 6555

[3] Hardingham TE, Fosang AJ, Hey NJ *et al.* The sulphation pattern in chondroitin sulphate chains investigated by chondroitinase ABC and ACII digestion and reactivity with monoclonal antibodies. *Carbohydr Res*, 1994, **255**(3): 241 - 254

[4] Kato F, Mimatsu K, Iwata H *et al.* Comparison of tissue reaction with chondroitinase ABC and chymopapain in rabbits as the basis of clinical application in chemonucleolysis. *Clin Orthop*, 1993, **288**(3): 294 - 302

[5] Tizzano EF, Buchwald M. CFTR expression and organ damage in cystic fibrosis. *Ann Int Med*, 1995, **123**(1): 305 - 308

[6] Arturo CAG, Luis GFJ, Nesburn AB *et al.* Enzymatic method and compositions for treating intravitreal hemorrhagic blood. US: 5866120, 1999-02-02

[7] Zuo J, Neubaner D, Graham J *et al.* Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp Neurol* 2002, **176**(1): 221 - 228

[8] Denholm EM, Lin YQ, Silver PJ. Anti-tumor activities of chondroitinase AC and chondroitinase B: inhibition of angiogenesis, proliferation and invasion. *Eur J Pharmacol*, 2001, **416**(3): 213 - 221

[9] Lee MC, Sung KL, Kurtis MS *et al.* Adhesive force of chondrocytes to cartilage effects of chondroitinase ABC. *Clin Orthop*, 2000, **370**(1): 286 - 294

[10] Ma SJ (马淑涛), Zhang TM (张天民). Methods for preparing various kinds of chondroitin sulfate. *Chinese Journal of Pharmaceuticals* (中国医药工业杂志), 1992, **23**(12): 557 - 560

[11] Hashimoto H. Chondroitinase ABC isolated from *Proteus vulgaris* ATCC 6896, US5496718, 1996-03-05

[12] Lin XS (林雪松), Hou LZ (侯立中), Yang TS (杨同书). Preparation of chondroitinase ABC. *Journal of Norman Bethune University of Medical Sciences* (白求恩医科大学学报), 1997, **23**(1): 104 - 105

[13] Sato N, Murata K, Kimura A. Depolymerization of chondroitin C sulfate by immobilized cells. *Biotech Bioeng*, 1986, **28**(3): 1707 - 1712

[14] Kitamikado M, Lee YZ. Chondroitinase-producing bacteria in natural habitats. *Appl Microbio*, 1975, **29**(2): 414 - 421

[15] Zhang LX (张龙翔), Zhang TF (张庭芳), Li LY (李令媛). Methods and Technology of Biochemical Experiment (生化实验方法和技术). Beijing (北京): High Education Press (高等教育出版社), 1997

[16] Wang JZ (汪家政), Fan M (范明). Manual of Protein Technology (蛋白质技术手册). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2000

[17] He F (贺枫), Zhuo RX (卓仁哲), Liu LJ (刘立建) *et al.* Studies on the preparation and characterization of immobilized papain. *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报) 2000, **31**(5): 637 - 640

[18] Yamagata T, Saito H, Habuchi O *et al.* Purification and properties of bacterial chondroitinase and chondrosulfatase. *J Biol Chem*, 1968, **243**(7): 1523 - 1535

[19] Hiyama K, Okada S. Crystallization and some properties of chondroitinase from *Arthrobacter aureus*. *J Biol Chem*, 1975, **250**(5): 1824 - 1828

[20] Kanan GU, Linhardt RJ, Laliberte M. Purification, characterization and specificity of chondroitin lyases and glycuronidase from *Flavobac-*

Purification and Immobilization of Chondroitinase from *Aeromonas sobria* YH 311

CAI Su-Lan YAN Hao-Lin* HE Han-Zhou

(The School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Chondroitinase has been used as an important tool in the study of the structure, function and distribution of glycosaminoglycans for many years. Recently, the enzyme has been reported to be a potential enzyme for chemonucleolysis, an established treatment for intervertebral disc protrusion. In this paper, a chondroitinase had been purified from the culture supernatant of *Aeromonas sobria* YH311 using a simple purification procedure of ammonium sulfate precipitation, QAE-Sephadex A50 ion exchange chromatography and Sephadex G-150 gel filtration. The immobilization of purified chondroitinase using sodium alginate or cellulose as carriers has also been studied. The chondroitinase obtained from *Aeromonas sobria* YH311 was purified 55-fold to 95.3% pure, the specific activity of the purified enzyme was 31.86u/mg and the yield was 37%. The molecular weight of chondroitinase from *Aeromonas sobria* YH311 was determined by SDS-PAGE to be 80kD, which was almost the same as those chondroitinase AC from *Arthrobacter aurescens*, *Aeromonas liquefaciens* and *Flavobacterium heparinum*. But its isoelectric point was 4.3~4.6, which was far lower than the microbial chondroitinase AC. After the immobilization on sodium alginate or cellulose, the properties of chondroitinase changed greatly. The optimum temperature and pH of the free enzyme were 50°C and 7.0 respectively, and about 10% activity remained after heat treatment at 80°C for 20 minutes, and 47% activity remained after two weeks storage at 4°C. The chondroitinase immobilized on sodium alginate had the optimum temperature and pH of 40°C and 7.0 respectively, about 50% activity remained after 80°C heat treatment for 120 minutes and 50% remained after 30 days storage at 4°C. The chondroitinase immobilized on cellulose had the optimum temperature and pH of 70°C and 6.0 respectively, and more than 70% activity remained after heat treatment at 80°C and 30 days storage at 4°C. The yield of the immobilization was very low, with 18.56% for alginate and 18.86% for cellulose.

Key words chondroitinase, purification, immobilized enzyme, sodium alginate, cellulose

Received: 12-29-2003

* Corresponding author. Tel: 86-24-23843711 ext 3513; Fax: 86-24-23843711 ext 3522; E-mail: haolin-yan@163.com

利用细胞凋亡原理治疗癌症

细胞凋亡 (apoptosis) 是致细胞死亡的重要机制之一, 是细胞一种生理性、主动性的“自觉自杀行为”, 犹如秋天片片树叶的“凋落”。这些细胞死得有规律, 似乎是按编好了的“程序”进行的, 所以又称之为“程序性细胞死亡”。它受细胞内部基因调控, 而调控凋亡的基因有两类: (1) 抑制细胞基因凋亡; (2) 启动或促进细胞凋亡。基于此, 可利用调控细胞凋亡基因的后者以启动和促进细胞凋亡。首先要找到这种基因, 分析其特定功能, 发挥其作用, 有可能研制比放疗、化疗更有效的诱导癌细胞死亡的药物, 最终达到促进和加速癌细胞的死亡。这种治癌方法有可能成为未来治疗癌症的一种独特新疗法。

也有利用杀癌细胞抗生素致使癌细胞加快凋亡。俄罗斯研究人员找到一种寡霉素的抗生素, 在低浓度的情况下可导致血癌细胞的程序性死亡, 且对健康细胞无害。浓度仅为 10~12mg/mL 的寡霉素溶液倒入混有淋巴性血癌细胞和健康淋巴细胞的培养液中, 血癌细胞的胞核会遭到破坏, 并大量死亡。进一步发现, 血癌细胞核内染色体物质发生凝集, 并分裂成碎片, 这是“细胞凋亡”的具体表现。寡霉素导致血癌细胞死亡时的浓度仅为抑制细胞呼吸所需浓度的 1/2000~1/6000。低浓度的寡霉素可能以某种方式影响了细胞程序性死亡过程中的信号传递, 导致血癌细胞程序性死亡过程加速, 只有癌细胞面临死亡, 而健康细胞的程序性死亡过程则受到抑制, 因此, 该细胞得以生存而继续活下去。

我国留美科学家王晓东院士 (美国科学院) 首先发现细胞色素 c 是启动细胞凋亡的重要因子, 这一发现对于诸多人类疾病, 特别是肿瘤等的产生机制、治疗方法以及药物研发均有重要价值。然而, 德国研究人员从另一方面思考, 通过抑制正常细胞凋亡以达到延长寿命的目的。他们在研究线虫时发现, 抑制细胞凋亡起决定性作用的是一种“SGK-激酶”的基因, 通过对它的调控可延长线虫的寿命 (注: 线虫通常只能活 14d), 因为这种酶直接控制着细胞凋亡的程序, 这一研究成果有助于理解细胞老化机制, 从而有针对性地治疗如血液循环疾病、肿瘤、早老性痴呆症等与细胞老化密切相关的疾病。

总之, 研究细胞凋亡不论是理论或应用方面均有重要意义, 从防病、治病和抗病方面考虑, 诱发细胞凋亡的分子生态学问题应深入探究。细胞凋亡的诱因除化学因素之外, 生物因素特别是某些病毒因素应引起重视, 它可能是引起细胞死亡的重要诱导因子。不论是何种因子的作用, 对其宿主正反两方面的功能作用都得密切关注, 从中去其弊而获其益, 使细胞凋亡分子生态学的研究更深入, 使其研究成果更好地服务于人类健康。

(柯 为 供稿)