

## 综述

# 治疗酶的研究进展

徐寒梅, 周长林, 郑珩, 吴梧桐

中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009

**摘要:** 随着生物技术和现代药剂学研究的进展, 酶类药物的应用取得了快速发展, 已成为生物药物的一个重要门类。以下对治疗用酶的新品种、作用机理和新技术在治疗酶中的应用、酶作为药物靶点的应用等进行了回顾, 并对未来治疗酶的发展方向进行了讨论。

**关键词:** 治疗酶, 新品种, 作用机理, 新技术

## Progress in the research of therapeutic enzyme

Hanmei Xu, Changlin Zhou, Heng Zhen, and Wutong Wu

Department of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract:** With the development of the research on biotechnology and modern pharmacy, the application of enzyme drugs have grown rapidly and enzyme drugs have become an important branch of biopharmaceutics. In this article, some new varieties of therapeutic enzymes, enzyme targets, mechanisms and new technologies of application in therapeutic enzymes were reviewed, and the direction of development of therapeutic enzymes were discussed.

**Keywords:** therapeutic enzyme, new varieties, mechanisms, new technologies

治疗酶是具有特色医疗作用的一类药物, 是医药宝库中的黄金。随着生物技术和现代药剂学研究的进展, 酶类药物的应用取得了快速发展, 已成为生物药物的一个重要门类。临床上广泛应用的酶类药物已达上百种, 中国药典收载了酶类药物 15 种、20 多个规格, 英美药典收载的酶类药物也有近十种。酶类制剂品种已超过 100 种, 主要应用于: 1) 酶替代治疗, 如腺苷脱氨酶、 $\beta$ -葡萄糖脑苷酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶等; 2) 胃肠道疾病的治疗, 如胰酶、胃蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶、木瓜蛋白酶等; 3) 炎症的治疗, 如溶菌酶、胰凝乳蛋白酶、菠萝蛋白酶、胰蛋白酶等; 4) 促进纤维蛋白溶解

的抗凝溶栓治疗, 如链激酶、尿激酶、纤溶酶、抗凝血酶 III、组织纤溶酶原激活剂(tPA)等; 5) 抗肿瘤酶, 如门冬酰胺酶、谷氨酰胺酶、神经氨酸苷酶等; 6) 其他治疗用酶, 如青霉素酶用于治疗青霉素过敏, 透明质酸酶用作药物扩散剂, 弹性蛋白酶用于降血脂、防治脂肪肝等。

近年来对治疗酶的作用机理更加明确, 涌现出一批特效的新酶品种, 许多新技术得到了广泛应用, 从而使酶类药物的疗效更确切, 副作用更小, 使用更安全, 也更易被临床所接受, 使酶类药物更具良好的应用前景。

**Received:** October 9, 2009; **Accepted:** November 6, 2009

**Corresponding author:** Wutong Wu. E-mail: wuwong@cpu.edu.cn

## 1 几种治疗酶的作用机理

目前酶类药物品种繁多, 作用机理也各不相同, 经过各国科学家多年的探索, 一些治疗用酶发挥其体内外生理活性的作用机制已经很清楚, 下面对几类治疗用酶的作用机理作一总结归纳。

### 1.1 治疗酶抗肿瘤的作用机制

#### 1.1.1 L-天冬酰胺酶治疗白血病的作用机制

L-天冬酰胺酶作为抗肿瘤药物, 它的作用机理在于它能够降低体内 L-天冬酰胺、L-谷氨酰胺及甘氨酸的浓度, 这 3 种氨基酸是合成嘌呤和嘧啶环的重要组成部分。敏感癌细胞的天冬酰胺合成酶活性不高, 对这些氨基酸的消耗率大于其本身的合成能力, 因此需要通过血液循环获得外援的氨基酸, 对这些敏感癌细胞来说, 天冬酰胺实际上是一种必需氨基酸。当外援的氨基酸被分解掉时, 癌细胞合成蛋白质和核苷酸的能力就会显著下降, 从而有效地抑制肿瘤细胞的繁殖; 当血液循环中的天冬酰胺浓度由于用天冬酰胺酶治疗而耗竭时, 这些癌细胞就被选择性地杀死; 而大多数正常细胞因有足量固有的或诱生的天冬酰胺合成酶, 所以在治疗中得以存活<sup>[1-2]</sup>。

研究还发现天冬酰胺酶的抗肿瘤作用还可能通过诱导肿瘤细胞凋亡而起作用, 药物与靶细胞-肿瘤细胞互相作用, 导致其线粒体功能改变释放 *cyc*, *cyc* 再与 Apaf-1 和 Preocaspase-9 相互作用形成凋亡小体复合物, 最后激活 Caspase-9 生成细胞凋亡调控剂与结构蛋白, 如多聚 ADP-核糖和聚合酶(PARP), 从而导致细胞凋亡。

#### 1.1.2 谷氨酰胺酶及其他类似酶的抗肿瘤作用机制

某些癌细胞可能缺乏一些催化其他非必需氨基酸合成的酶类。在正常的情况下, 可能并不显现缺乏这些酶的差别, 因为体液内高浓度的非必需氨基酸可供它们的需要。酶治疗耗竭了某些特定的氨基酸时, 才突出了该氨基酸的需要, 并选择性地杀死癌细胞。

在氨基酸耗竭疗法中, 谷氨酰胺似乎是一种最适合的药物。因为谷氨酰胺的合成只有一条单一的途径。这条合成途径将不能满足一些肿瘤细胞对高

含量谷氨酰胺的需要。细胞对谷氨酰胺的需要, 不仅是由于大多数蛋白质中含有谷氨酰胺, 而且还由于它在一些细胞氮的代谢、氮的转移以及产生能量等方面起了主要作用。谷氨酰胺在谷氨酰胺酶催化下脱去酰胺基生成氨和谷氨酸。

同理, 据报道, 精氨酸酶、丝氨酸脱水酶、苯丙氨酸氨解酶和亮氨酸脱氢酶等也具有抗肿瘤作用。类似地, 喋呤脱氨酶由于能使喋呤、叶酸等脱氨, 切断嘧啶核苷酸等的供应, 因而同样有抗肿瘤活性。

#### 1.1.3 抗肿瘤核酶

核酶(Ribozyme, Rz) 是一类具有生物催化活性的 RNA 分子, 能够定点切割特定的 mRNA 靶分子, 从而有效地阻断特定基因的表达, 发挥其生物学作用。20 世纪 80 年代初期, Kruger 等<sup>[3]</sup>在研究核糖核酸(RNA)时, 发现一类具有酶活性的 RNA 分子能催化磷酸二酯键水解和形成, 并将其命名为核酶, 这一发现结束了所有酶都是蛋白质这一传统概念。由于核酶可通过碱基配对特异性地与靶 RNA 底物结合, 定点切割 mRNA 靶分子, 被形象地称为“分子剪刀”。利用核酶技术进行肿瘤及抗病毒的基因治疗已成为一项重要手段。目前研究发现, 核酶抗肿瘤作用是通过以下途径:

1) 抗新血管生成: 绝大多数肿瘤增殖需要新血管生成, 直径大于 1~2 mm 的肿瘤必须依靠新生血管运输养料和废物, 才能维持生长, 另外新生血管还是肿瘤细胞转移的途径。研究证实, 若抑制新血管的生成, 就能促使肿瘤消退。目前认为新血管生成的一个重要原因是由肿瘤细胞分泌的血管生成因子所介导, 而最有效的血管生成因子是血管内皮生长因子(VEGF), VEGF 的表达可调控肿瘤细胞的生长。核酶可以通过降低、下调 VEGF 和其受体(VEGFR)的基因转录和蛋白表达达到抑制肿瘤生长的效果。

目前, 有多项研究表明针对 VEGF 和其受体 VEGFR 的核酶治疗肿瘤效果显著, 如 Tokunaga 等<sup>[4]</sup>将抗 VEGF189 的核酶转染到胰腺癌细胞系 MIA PaCa2, 结果表明, 导入核酶后可抑制 VEGF 的水平, 有效抑制肿瘤血管生成和肿瘤转移。Ciafrè 等<sup>[5]</sup>针对 VEGF mRNA 设计的锤头状核酶, 导入恶性胶质瘤

细胞, 结果发现 VEGF 的表达下降了 56%左右。由 Ribozyme 制药公司和 Chiron 公司合作开发的 Angiozyme 是一种以核酶(Ribozyme)为基础的药物, 以血管内皮生长因子受体为靶点, 目前正处于抗乳腺癌和实体瘤的 II 期临床, 这也是第一个进入临床的化学合成的核酶类药物, 在多种肿瘤和与血管增生有关的眼病动物模型中都显示了生物活性<sup>[6-9]</sup>。

2)核酶抗肿瘤相关基因: 在肿瘤细胞发生和发展过程中, 存在着一些基因, 刺激癌细胞的生长和分化(如突变的 *ras* 基因)、抑制细胞凋亡(如 *Bcl-2*、*Bcl-x1*)、促进细胞增殖(如在 *Bcl-2* 基因提供存活信号的刺激下, *C-myc* 基因起促进细胞转化与增殖的作用)等作用, 从而促进肿瘤的发生和发展。而一些研究人员发现, 通过设计, 核酶具有抑制这些肿瘤相关基因的作用, 从而达到抑制肿瘤生长的效果<sup>[10-12]</sup>。

3)核酶抗多药耐药基因: 人类多药耐药基因 (Multidrug resistance gene, MDR)编码一种使药物排出细胞的糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp), 该蛋白既有与抗癌药结合的部位, 又有与 ATP 结合的位点, 凭借 ATP 提供的能量, P-gp 将进入细胞的药物泵出细胞外, 结果降低了细胞内抗癌药的浓度, 导致癌细胞的耐药现象, 不利于肿瘤的化疗。为此, 许多学者都尝试利用核酶技术抑制 P-gp 的过表达, 以提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

1994 年 Kiehnopf 等<sup>[13-14]</sup>选择靠近起始位点-6 到-4 的 GUC 三联码为识别、切割的位点, 通过体外转录法和化学合成法制备了针对 MDR1 mRNA 的核酶。他们发现, 无论是体外转录法制备的 MDR-1-核酶, 还是化学合成法制备的 MDR-1-核酶, 都能在细胞外生理体系中特异性地有效切割 MDR1 mRNA, 得到预期大小的片段, 使肿瘤细胞对化疗药物的敏感性降低。此后的一些研究也证实了设计合理的 MDR1 mRNA 核酶能完全或部分抑制肿瘤细胞表达 MDR 基因, 阻断或减少 P-gp 的生成。

## 1.2 治疗酶溶解血栓的作用机制

应用酶制剂治疗血栓栓塞病在酶疗法中是最引人注目。纤溶酶、尿激酶、链激酶、米曲去纤酶、蛇毒去纤酶、tPA、 $\gamma$ APC、纳豆激酶、蚓激酶等血栓溶解酶已用于治疗脑血栓、肺栓塞、四肢与周围

血管血栓、视网膜血管栓塞及心肌梗死等多种血栓栓塞病。

血液在血管内的流动与凝固是由若干酶所催化的两类相反的化学连锁反应决定的。如图 1 所示, 这两类化学连锁反应构成了凝血与抗凝血的一对矛盾。抗凝血系统或称纤维蛋白溶解系统(简称纤溶系统)的关键酶是纤溶酶。它的前身是纤溶酶原, 经过激活剂的作用可转变成有活性的纤溶酶。这种酶可将纤维蛋白与纤维蛋白原溶解。如果这种纤溶过程发生在血液内就可以防止血液凝固, 若发生在血栓内部, 则可以使血栓溶解。临床上所用的溶解血栓的酶可分为 3 类: 一类能直接作用于纤维蛋白或纤维蛋白原, 如纤溶酶、米曲去纤酶及蛇毒去纤酶; 另一类通过激活纤溶酶原间接作用于纤维蛋白或纤维蛋白原, 如链激酶、尿激酶和 t-PA。这两类酶虽然作用方式不同, 但是最终的结果是相同的, 即分解纤维蛋白或纤维蛋白原达到抗凝血或溶解血栓的目的。还有一类抗凝抗栓剂是作用于凝血酶的, 如水蛭素, 它是凝血酶的专一抑制剂可以有效地抑制血栓的形成, 又如重组活性蛋白质 C( $\gamma$ h-APC), 它是反馈抑制凝血酶的产生和阻止纤维蛋白的形成, 也是良好的抗凝、抗栓剂。

### 1.2.1 蛋白质 C 的抗血栓形成机制

活性蛋白质 C 的抗凝作用是通过反馈抑制凝血酶的产生而起作用的, 是一种生理性调控作用。凝血过程是凝血酶原转变成凝血酶, 再使纤维蛋白原转变成不溶性纤维蛋白, 才维持正常的凝血作用。蛋白质 C 本身是一种丝氨酸蛋白酶, 它在血循环中是一种无活性的酶原。当产生凝血酶时, 蛋白质 C 与 TM(一种内皮细胞表面膜蛋白)结合成复合物, 形成了生理性酶复合物, 它将酶原蛋白质 C 转化成活性酶 APC, APC 与其辅因子蛋白质 S 一起通过灭活因子 V 和 VIII 而阻断凝血酶的产生。这对于正常的止血作用或病理性血栓形成起关键作用。另外 APC 也具有降解纤维蛋白原的作用, 它通过中和纤溶酶原激活剂的抑制剂(PAI-1)而增加纤溶活性, 并有利于从血循环中清除 PAI-1, 说明 APC 在纤溶活性中起重要作用。

### 1.2.2 组织纤溶酶原激活剂(tPA)的溶栓机制

将血块去除或降解的纤溶作用是通过 tPA 启动的一个蛋白质水解过程, 因为 tPA 活化了纤溶酶原生成纤溶酶, 再反复作用于血块中的纤维蛋白链。从而促使纤维蛋白的有效溶解与去除。

如图 2 所示, tPA 通过活化纤溶酶原生成纤溶酶而起蛋白质水解作用, 从而达到溶解纤维蛋白的作用。纤溶酶原由肾脏合成进入血液循环, 是 90 kD 的糖蛋白, 通过多对二硫键结合而稳定。tPA 切割纤溶酶原的单一肽键 Arg561-Val562, 生成丝氨酸蛋白酶-纤溶酶, 纤溶酶的 N-端有若干 Lys 结合位点, 活性

中心在 C-末端, 纤溶酶的赖氨酸结合位点有利于与纤维蛋白的结合(使其有效地靠近血块表面), 纤维蛋白有纤溶酶原和 tPA 的两个结合位点, 促使两者同时结合到血纤维上, 有利于纤溶酶原的激活及对纤维蛋白的降解作用。

### 1.3 胰酶制剂治疗慢性胰腺炎的作用机制

胰酶制剂主要用来改善胰腺外分泌功能不全以及缓解胰源性疼痛, 同时阻止疾病进程和预防并发症。胰腺外分泌功能不全可以导致胰酶, 主要包括脂肪酶、淀粉酶和蛋白酶的分泌不足而引起的消化不良。胰酶制剂替代治疗是纠正胰源性消化不良的主要措施。

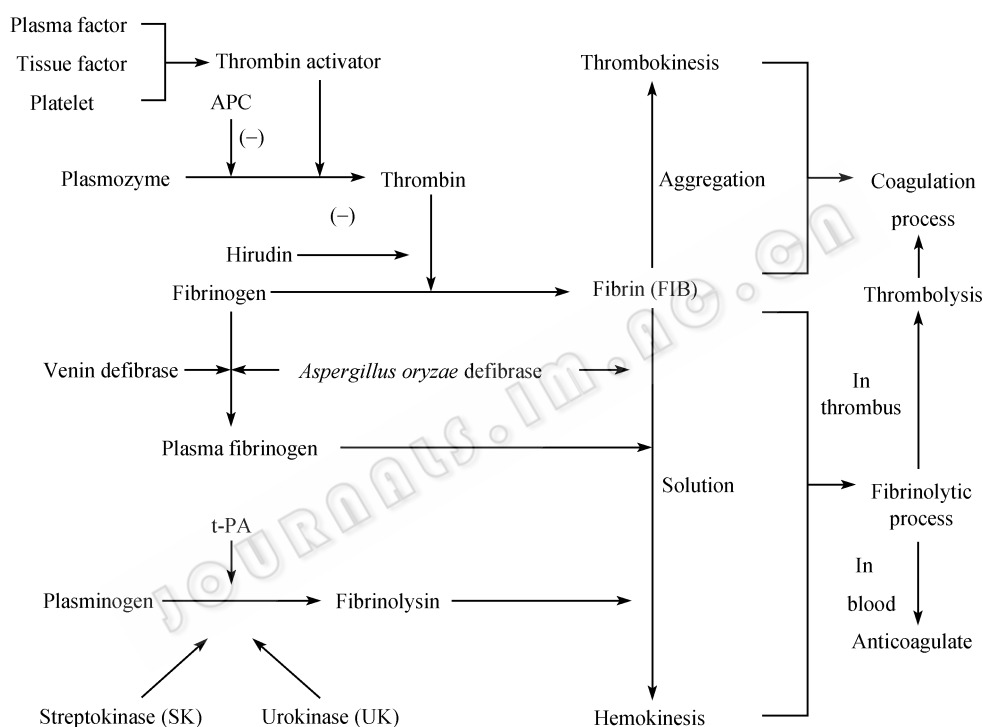


图 1 凝血与纤溶过程  
Fig. 1 Coagulation and fibrinolytic process.

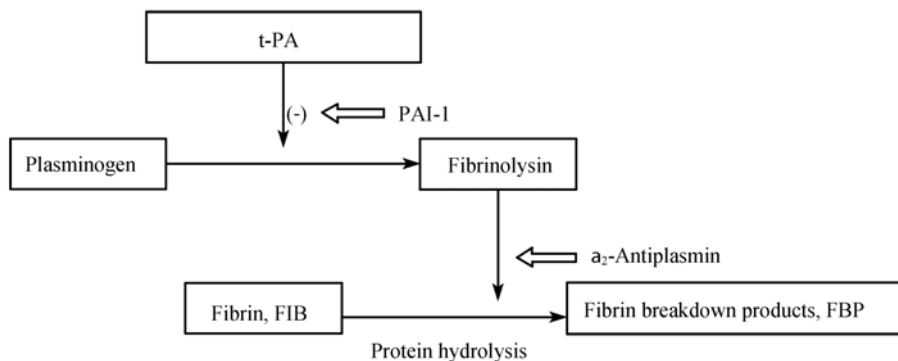


图 2 t-PA 与纤溶过程  
Fig. 2 t-PA and fibrinolytic process.

### 1.3.1 治疗胰腺外分泌功能不全

正常胰腺每天分泌的蛋白质为 5~8 g, 大部分是消化酶, 这些酶的数量远多于为维持营养物质和脂溶性维生素正常吸收所需量。患慢性胰腺炎(CP)时胰脂肪酶需 10 年才会降至正常分泌量的 10%以下, 影响食物中甘油三酯的分解而出现脂肪泻, 同时影响维生素 A、维生素 D、维生素 E、维生素 K 的吸收。因此, 适当补充脂肪酶是治疗胰腺外分泌功能不全的基础。当 CP 病人发生脂肪泻, 大便中脂肪排量 >15 g/d 时, 应给予胰酶替代治疗。

### 1.3.2 缓解胰源性疼痛

利用胰酶制剂来缓解胰源性疼痛的机制尚不完全清楚, 其机制可能与胰酶参与的胰腺外分泌的负反馈抑制有关。正常人空腹时, 胰腺基础分泌液中的胰蛋白酶使 CCK 释放肽变性, 进而使 CCK 的释放保持在较低水平的稳定状态, 并使胰酶的基础分泌保持在恒定的低水平。患 CP 时胰腺分泌胰蛋白酶减少, 无足够的胰蛋白酶使 CCK 释放肽变性, 因此后者浓度增高, 使 CCK 释放增多, CCK 对胰腺的强刺激使胰酶的分泌增加而引发疼痛。如有胆管梗阻, 胰酶还可外渗至间质。另一方面, CCK 与胰泌素有协同增加胰液流量的作用, 从而增加胰管内压力。口服胰酶可使十二指肠内胰蛋白酶增加, 使 CCK 释放肽更完全地变性, CCK 释放减少导致胰腺分泌胰酶减少。给予有效的胰酶替代治疗, 可减少胰腺分泌的刺激, 降低胰管内压力, 从而使疼痛缓解。

## 2 新技术在治疗酶中的应用

虽然酶类药物具有非常明显的优势, 但由于已开发成功的酶类药物大多属于异种蛋白, 治疗中可能出现免疫反应或副作用; 另外, 酶通常在细胞内含量非常低, 要产业化难度大, 这就限制了天然酶的应用。新技术的应用则拓宽了酶的应用范围。

### 2.1 重组 DNA 技术应用于治疗酶

基因工程技术的发展和应用于治疗用酶的实用化开辟了有效的途径。只要生物细胞中存在酶, 即使其含量很低, 应用基因工程技术, 通过基因扩增与增强表达, 就可能建立特定酶的基因工程

菌或基因工程细胞, 从而进一步构建新一代的催化剂-固定化工程菌或固定化工程细胞。如德国 BM 公司应用蛋白质工程技术, 对表达青霉素酰化酶的基因进行点突变改造, 重建了青霉素酰化酶工程菌, 从而大大延长了固定化青霉素酰化酶的使用半衰期, 其固定化酶柱可连续使用 700 d 以上。目前, 世界各国争相采用基因工程方法开发新的酶类药物并有不少品种已进入 I 或 II 期临床, 这些品种有尿激酶、超氧化物歧化酶、天冬酰胺酶、黄嘌呤氧化酶和溶葡萄球菌酶等。重组 DNA 技术促进了酶类药物的发展, 已经成为当今世界酶类药物的研究热点<sup>[15]</sup>。

另外, 运用基因工程技术可以改善原有酶的各种性能, 如提高酶的产量、增加酶的稳定性、使酶适应低温环境、提高酶在有机溶剂中的反应效率、使酶在后提取工艺和应用过程中更容易操作等。运用基因工程技术也可以将原来由有害的、未经批准的微生物产生的酶的基因, 或由生长缓慢的动植物产生的酶的基因, 克隆到安全的、生长迅速的、产量很高的微生物体内, 改由微生物来生产。

### 2.2 治疗酶的分子设计

酶分子本身蕴藏着很大的进化潜力, 许多功能有待于开发。分子酶工程设计可以采用定点突变(Site directed mutagenesis)和体外分子定向进化(*In vitro* molecular directed evolution)两种方式对天然酶分子进行改造。

#### 2.2.1 定点突变

定点突变(Site-directed mutagenesis)是指通过聚合酶链式反应(PCR)等方法向目的 DNA 片段中引入所需变化, 包括碱基的添加、删除、点突变等。定点突变能迅速、高效提高 DNA 所表达的目的蛋白的性状及表征, 这一技术也成为研究酶结构与功能的常规手段, 并被广泛用于改善酶的性能。对天然酶蛋白的催化性质、底物特异性和热稳定性等进行改造已有很多成功的实例。其中最成功的例子是利用定点突变法在枯草杆菌蛋白酶(SBL)的特定位点中引入半胱氨酸, 然后用甲基磺酰硫醇试剂进行硫代烷基化, 得到一系列新型的化学修饰突变枯

草杆菌蛋白酶。突变后绝大部分 CMM 的  $K_{cat}/K_m$  值都大于天然酶, 有些甚至增加了 22 倍<sup>[16]</sup>; 还有报道利用 Ala 扫描改进 L-门冬酰胺酶抗原表位区域的肽段, 但并不影响酶活力<sup>[17]</sup>。

### 2.2.2 治疗酶的化学修饰

酶分子的化学修饰是指在分子水平上对酶进行改造, 包括对酶分子主链结构的改变和对其侧链基团的改变。前者是分子生物学层次上的修饰, 即在已知酶的结构与功能关系的基础上, 有目的地改变酶的某一活性基团或氨基酸残基, 从而使酶产生新的性状, 又称理性分子设计, 主要应用于改造酶的底物特异性、催化特性及热稳定性。后者是利用大分子或小分子修饰剂对酶分子的侧链进行改造, 以获得具有临床和工业应用价值的酶蛋白, 是目前应用最广泛的酶化学修饰技术。

目前主要的化学修饰方法有蛋白质交联、单功能聚合物化学修饰蛋白质、小分子化合物的化学修饰法和辅因子引入。

蛋白质交联<sup>[18]</sup>, 利用双或多功能交联剂对酶进行分子间和分子内交联, 提高生物催化剂的稳定性, 尤其是在非水溶液中的稳定性, 已取得较好的研究进展。使用的交联剂有戊二醛、葡聚糖二乙醛、蔗糖二乙醛单体或多聚体、高分子硫醇盐和马来酰胺等。

单功能聚合物化学修饰蛋白质<sup>[19]</sup>, 利用大分子化合物如单甲氧基聚乙二醇 (MPEG)、羧甲基纤维素、右旋糖酐、糖酯、壳聚糖、果胶等对酶蛋白表面进行修饰, 通常可以增加酶的热稳定性, 降低蛋白质的免疫性和抗原性。

X-射线测试结果表明, 蛋白质表面的一半基团由非极性氨基酸组成, 蛋白球体的非极性表面原子簇与水接触不利于酶的稳定。因此, 利用小分子化合物的化学修饰法<sup>[20]</sup>使蛋白球表面亲水化以提高酶的稳定性, 这已在胰蛋白酶中取得了成功。已采用的小分子化合物包括单功能或双功能试剂, 主要有氨基葡萄糖、醋酸酐、硬脂酸、邻苯二酸酐、醋酸-N-丁二酰亚胺酯、二甲基辛二酸亚胺酯等。

很多酶都含有辅酶或辅基活性基团。天然酶中这些基团的种类有限, 因而限制了酶的功能。辅因

子引入<sup>[17]</sup>是指在一已知蛋白或酶的特定位点引入一个辅因子或新的功能基团, 以合成新的蛋白或酶, 拓宽酶催化的底物。如使  $Cu(Phen)^{2+}$  配合物与脂肪细胞脂质结合蛋白 (Adipocyte lipid binding protein, ALBP) 共价结合, 生成半合成金属酶 ALBP-Phen-Cu (II)。该酶可对映选择性水解多肽, 其对映体过量值达 86%, 同时其水解芳香族酰胺化合物的活性也明显提高。

## 3 治疗酶的新品种和应用

随着新技术在治疗用酶的研究和生产中的应用, 新的治疗用酶品种也不断出现。治疗酶新品种的研发热点主要集中在以下几个方面: 1) 研究和开发基因工程酶类药物, 尤其是重组人源性酶类药物, 如重组尿激酶、重组半乳糖苷酶等; 2) 通过蛋白质工程的方法对酶进行分子改造, 提高临床疗效或降低毒副作用及抗原性。例如组织型纤维蛋白溶酶原激活剂突变体; 3) 对酶进行化学修饰, 提高酶的稳定性、延长半衰期并提高其生物利用度, 如 PEG 修饰的门冬酰胺酶用于治疗小儿白血病等。

### 3.1 研发中的溶栓酶

溶栓药物的使用已有 10 余年的历史, 目前临床上使用的溶栓药物可分成 3 代。第一代以尿激酶 (Urokinase)、链激酶 (Streptokinase) 为代表, 价格较低廉, 但尿激酶能直接激活循环中的纤溶酶原, 对纤维蛋白无选择性, 容易引起全身性纤溶激活、具有出血危险性; 第二代以组织型纤维蛋白溶酶原激活剂 (Tissue plasminogen activator, tPA)、重组组织型纤维蛋白溶酶原激活剂 (Recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)、单链尿激酶类纤溶酶原激活剂 (Scu-PA, 也称作 u-PA 或尿激酶原) 为代表。tPA 对循环血液中纤溶酶原作用很弱, 对与纤维蛋白结合的纤溶酶原作用则强数百倍, 对血栓部位有一定的选择性, 在症状发作后的短时间内给药对恢复再灌注作用明显, 但由于半衰期较短 (约 3 min), 需短时间内大量给药, 价格昂贵, 而且引起颅内出血的危险较大。

为了克服野生型 tPA 的缺点, 各国均致力于第

三代溶栓药的开发和研究,它们具有延长半衰期、更快更彻底溶栓的作用和较少颅内出血的危险等优点。目前正在开发的溶栓药物可归纳为以下几类:

### 3.1.1 tPA 的衍生物

tPA 的衍生物目前已有产品上市,如瑞替普酶,在临床上取得了很好的疗效。还有许多品种正在开发中,如由日本三得利开发研究的拉诺普酶(Lanoteplase, nPA),是 tPA 的缺失和定点突变体,改造后的 nPA 具有半衰期长、活性强的优点,目前正在临床研究中;另外,由 Novartis AG 公司开发的由 tPA 和单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(scu-PA)的 cDNA 的融合表达的 Amediplase(K1K2Pu 嵌合体),具有强效、长效、安全性高的特点<sup>[21-22]</sup>。

### 3.1.2 葡激酶及其突变体

葡激酶(Staphylokinase, Sak)是近年来新型溶栓剂研究的热点之一。在金黄色葡萄球菌中, sak 基因总共编码一个 163 个氨基酸的蛋白,在分泌成熟过程中其 N 端 28 个氨基酸被切去而成为具有 136 个氨基酸的单链多肽。目前,在自然界中已鉴定的突变体有 3 个,分别是 Sak42D、SakΦC 和 SakSTAR,3 个突变体只有 3 个位点的氨基酸不同,对纤溶蛋白原活性相差不大,仅在热稳定性上有差异, SakSTAR 的热稳定性最好,具有较好的应用价值。重组 Sak 治疗心肌梗塞的临床研究表明,它至少与重组 rt-PA 有等同的溶栓疗效,但 Sak 激活纤溶酶原的选择性更强,几乎不激活循环系统的纤溶酶原。Sak 拥有这些优点的同时,也表现出了两方面的缺点:1) 在溶栓治疗 2 周后,73%患者产生高滴度的特异性 IgG 抗体;2) Sak 的血浆半衰期短,大约为 3 min。对 Sak 结构改造的主要目的是为了解决这两方面的问题,目前,对 Sak 进行定点突变、聚乙二醇修饰、Sak 与其他的功能成分联合构建融合蛋白等研究层出不穷,以期得到高效、低毒副作用的溶栓剂<sup>[23-26]</sup>。

### 3.1.3 尿激酶原

重组人尿激酶原(rhPro-UK),又称为单链尿激酶型纤溶酶原激活剂,为尿激酶(Urokinase, UK)的前体;由 411 个氨基酸残基组成,是一种相对分子质量为  $5.0 \times 10^4 \sim 5.4 \times 10^4$  的糖蛋白。含有 12 对二硫键,主要被纤溶酶,也可被激肽酶等通过水解

Lys158-Ile159 肽链而转化为双链的尿激酶分子;也可被凝血酶切开其 Arg156-Phe157 肽键而成为另一种更接近尿激酶原性质的双链分子(Thromb-UK)。

从作用机制上看,尿激酶原具有两个明显优于 tPA 的特点:1) 尿激酶原在血浆中不与蛋白水解酶抑制剂形成共价复合物,使其在碰到血块之前,不会消耗血液中的蛋白水解酶抑制剂而被中和掉。这些抑制剂的存在与防止全身性出血直接相关。而 tPA 则与抑制剂形成共价复合物,既消耗自身,又降低血液中抑制剂含量;2) 尿激酶原具有栓塞血栓专一性,造成出血的不良反应发生率更小些<sup>[27]</sup>。

### 3.1.4 纳豆激酶

纳豆激酶(Nattokinase, NK; 也称 Subtilisin NAT, Subtilisin BSP)是由纳豆枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* var. *natto*)产生的一种具有强烈溶栓功能的蛋白酶,是一种枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin)。1987 年日本的须见洋行博士从 200 余种食品中筛选出的有很强溶解纤维蛋白作用的纳豆食品。并从其中提取纯化出这种酶,由于是从纳豆中获得,因此称为纳豆激酶。实验研究证实该酶不仅易于提取纯化,成本低廉,溶栓效果好,作用迅速,药效时间长,而且安全性好。因此纳豆激酶也是溶栓药物中研究开发的热点<sup>[28-29]</sup>。

### 3.1.5 重组蚓激酶(ePA, lumbrokinase)

蚯蚓纤溶酶(Earthworm plasminogen activator, EPA),又称作蚓激酶(Lumbrokinase, LK),是从蚯蚓体内提取的一种具有纤溶活性的蛋白水解酶。它广泛分布于蚯蚓的消化道腔中,能直接降解血中纤维蛋白原及激活纤溶酶原为纤溶酶,刺激血管内皮细胞释放 t-PA。自从蚯蚓粗提物中分离到一组具有纤溶酶活性的蛋白质以来,蚓激酶作为溶栓药物已先后在韩国和中国上市,在脑血管血栓性疾病治疗中显示出明显的疗效。目前所用蚓激酶均是从蚯蚓体内提取的蛋白质混合物,不同批次间酶活性不一致,且含有一些不必要的蛋白组分。随着生物高新技术的迅速发展和蚓激酶研究的逐步深入,开发蚓激酶基因工程药物的条件逐渐成熟<sup>[30]</sup>。

## 3.2 研发中的抗肿瘤酶

癌症是人类最难对付的顽症之一,我国癌症死

亡率在所有疾病中居第 2 位。从天然材料中分离筛选抗肿瘤物质仍是抗肿瘤药物的重要来源之一, 其中有一些酶类物质被发现具有抗肿瘤作用, 如 L-天冬酰胺酶是一个广泛应用于儿童急性淋巴细胞白血病治疗的酶类药物。临床上用于抗肿瘤研究的还有精氨酸脱亚胺酶、核糖核酸酶、核酶等。

精氨酸脱亚胺酶<sup>[31-33]</sup>是 Wilm 等发现的另一种具有天冬酰胺酶相同功效的蛋白质, 经鉴定为支原体来源的精氨酸脱亚胺酶(Arginine deiminase, ADI, E.C. 3.5.3.6), 该酶可抑制动脉血管内皮细胞增生。相关研究进一步证实, 精氨酸脱亚胺酶不但能抑制多种恶性肿瘤细胞的体外增殖, 还能够抑制体内的恶性肿瘤的增生。

核糖核酸酶(Ribonuclease, RNase)在 RNA 代谢过程中起着重要作用, 已有多种 RNase 在不同动物的不同组织内经提纯获得, 如牛胰核糖核酸酶 A(RNaseA)、北美豹蛙卵母细胞及胚胎中获得的 RNase(Onconase, ONC)、美洲牛蛙中分离的 RC-RNase、牛精液中的 RNase (BS-RNase)、人胰腺 RNase(RNase I)。越来越多的研究表明它们具有抗肿瘤活性, 可以通过破坏 RNA 发挥抗肿瘤作用。

核酶(Ribozyme, Rz)是一类具有生物催化活性的 RNA 分子, 能够定点切割特定的 mRNA 靶分子, 从而有效地阻断特定基因的表达, 发挥其生物学作用。目前, 利用核酶技术进行肿瘤及抗病毒的基因治疗已成为一项重要手段。

### 3.3 开发中的其他酶类治疗药物

近年来, 酶类药物的研究和开发一直没有间断, 新品种也不断出现, 还有一些品种正在研制中, 归纳起来主要有: 1) 治疗遗传性疾病的酶替代治疗药物, 如目前至少治疗 3 种黏多糖储积病(MPS)的酶替代治疗正在研究中: Aldurazymel(玻璃酸酶类药物)、硫酸艾杜糖醛酸硫酸酯酶、Aryplase(重组人 N-乙酰基半乳糖胺-4-硫酸酯酶类药物); 2) 治疗组织损伤, 如 Debrase 是 MediWound 公司开发的由菠萝中提取出的酶混合物, 能选择性消化人坏死皮肤组织, 清创后基底面暴露了更多的皮肤成分, 上皮更容易自然生成, 该药已进入 II/III 期临床; Vibriolase(重组 vibriolysin)是 Biomarín Pharm 公司从一种由海洋微

生物中得到的蛋白水解酶, 对灼伤后的变性蛋白质有一定的功效, 可用于治疗烧伤, 用以评价它的安全性及清创灼伤后的伤口功效的 I 期临床试验显示出较好的结果; 3) 脱氧核糖核酸酶 I<sup>[33]</sup>(Deoxyribonuclease I, DNase I)是最早发现的一种特异性核酸内切酶, 作用于双链 DNA 的磷酸二酯键, 产生带有 5'-磷酸、3'-羟基末端的寡核苷酸。由于最初在消化道中被发现, 曾一度认为它仅是一种消化酶, 作用是为体内核苷酸的补救合成途径提供寡核苷酸。近年来的研究发现 DNase I 与细胞凋亡、个体发育及自身防御等有着密切的联系, DNase I 活性在哺乳动物消化系统之外的组织中比在消化系统中更高, 提示 DNase I 体内还具有其他的功能, 在临床上可能具有广阔的应用前景。

## 4 酶作为药物靶点的研究

酶的诊断和治疗作用还体现在其作为药物靶点, 可以筛选出新型的疾病治疗药物。药物靶点是指药物在体内的作用结合位点, 包括基因位点、受体、酶、离子通道、核酸等生物大分子。现代新药研究与开发的关键首先是寻找、确定和制备药物筛选靶—分子药靶。迄今已发现作为治疗药物靶点的总数约 500 个, 酶也是其中重要的一员, 包括了蛋白酶、水解酶、激酶、聚合酶和核酸酶等多种类型。以糖尿病为例, 酶功能的紊乱在糖尿病的发生、发展过程中占有重要地位, 与糖尿病关系较为密切的酶, 包括  $\alpha$ -葡萄糖苷酶、醛糖还原酶、一氧化氮合酶、血管紧张素转换酶、肉碱脂酰转移酶 和、蛋白激酶 C、二肽基肽酶、蛋白酪氨酸激酶、蛋白酪氨酸磷酸酶等等。其他的以酶作靶点进行药物筛选的研究还很多, 如美国国立牙齿及颅面部研究所的科学家发现一种蛋白裂解酶 matriptase 与肿瘤的发生紧密相关: matriptase 可以诱发肿瘤, matriptase 在多种上皮来源的肿瘤中(如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、大肠癌及口腔癌等)均高水平表达。而且研究还发现 matriptase 作为一种癌基因, 位于细胞表面, 省去了像其他靶向药物的设计时不得不考虑进入细胞的适当的有效药物浓度和半衰期问题, 易于对它的表达进行调控, 更有助于开发以它为靶



位的抗癌药物。另外,环腺苷酸(cAMP)-特异性磷酸二酯酶 4(PDE4)也是目前最热门的药物靶点之一,其抑制剂在临床已表现出对数种炎症性疾病有效,包括哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、过敏性鼻炎和过敏性皮炎等,在动物模型上对其他多种疾病包括关节炎、败血症等也有效。还有报道以  $\beta$ -酮脂酰-ACP 合成酶(Fab)为靶点的新型抗生素的开发也具有很好的前景、并已经筛选出一种很有希望用于临床的 Fab 抑制剂 platensimycin<sup>[34-36]</sup>。

## 5 治疗酶的增效作用

近年来,许多实验和临床研究证明酶对许多药物如抗肿瘤药物、抗生素、激素、细胞毒药物等具有增强疗效的作用。这一发现可能为酶在治疗上的应用开拓新的领域。

### 5.1 治疗酶对抗生素的增效作用

1963年 Seneca 与 Peer 首次发现酶对药物具有增效作用<sup>[37]</sup>,经过多次实验 Seneca 与 Peer 得出结论:糜蛋白酶能够增强肠道对四环素的吸收,后经过多位科学家实验证明糜蛋白酶还能够增加其他抗生素如巴龙霉素、四环素、红霉素与氯霉素的增效作用。

### 5.2 治疗酶对激素的增效作用

1969年 Wohlman 等<sup>[38]</sup>由大鼠与豚鼠观察到糜蛋白酶与强的松龙有协同消炎作用。通过各种物质如氯化锂、溶菌酶、甲基水杨酸、组胺及干冰等诱发炎症损害。将实验动物分为对照与治疗两大组,后者又分为5组:1)腹腔注射糜蛋白酶;2)口服糜蛋白酶;3)腹腔注射糜蛋白酶加强的松龙;4)口服糜蛋白酶加强的松龙;5)单用强的松龙。照相记录炎症消退的情况。结果发现,联合用药者治愈最彻底,比单独用一种药的疗效好得多。说明上述结果不仅仅是两种药物已知消炎作用的加和,糜蛋白酶还可能引起细胞通透性改变使得固醇类激素的组织穿透力增强。

### 5.3 治疗酶对细胞毒药物的增效作用

给各种癌症转移病人同时服用环磷酰胺与胰蛋白酶糜蛋白酶可以改善疗效。虽然不能证明生存时间有明显延长,但是在用此方法所治疗的许多病人中全身情况得到改善。治疗酶可能增加细胞毒类药

物的血中浓度或者使肿瘤细胞对药物的通透性增加,或者影响药物与蛋白质结合。还有实验研究发现,rhMnSOD 与 ADR 联合应用,可以通过刺激免疫系统和促进淋巴细胞进入肿瘤组织后杀死肿瘤细胞,从而有明显的增效作用<sup>[39]</sup>。

虽然治疗酶对药物的增效作用的精确机制尚不清楚,但可以通过某些治疗酶使一定剂量的药物增强治疗作用,更重要的是可以使某些药物的副作用和毒性反应减至最低程度。

## 6 结束语

随着现代生物技术以及现代药剂学的发展,治疗用酶取得了重大进展,首先,发现了许多新的治疗酶品种,如用于治疗恶性免疫综合缺陷症的腺苷脱氢酶,用于治疗血栓症的尿激酶原和 r-PA,用于治疗囊性纤维变性的 DNA 和用于治疗 Fabry 病的  $\alpha$ -半乳糖苷酶( $\alpha$ -galactosidase)和用于治疗 Gaucher's 病的葡萄糖脑苷酶(Glucose ceramidase)等;其次,在原有品种的基础上,通过化学修饰改善了酶的性质,延长了其体内半衰期,降低了毒副作用,使药物的有效性与安全性得到了提高,如用聚乙二醇(PEG)共价修饰酶类药物取得了明显成效。PEG-L 天冬酰胺酶,PEG 化腺苷脱氢酶都已广泛用于临床;第三,成功研制了许多酶类药物新剂型,除了前面提到的品种,还有:如 SOD 脂质体、蛇毒抗栓酶复乳、多酶微球和糜蛋白酶、葡聚糖酶纳米制剂等;第四,应用定点突变技术、基因改组技术和定向进化技术等蛋白质工程技术研制出了新型治疗酶,如 FDA 已批准的 r-PA 和 TNF-tPA 是 t-PA 的突变体,它们具有溶栓效果好、使用剂量小、使用方便和安全性较高的特点。

随着现代生物技术与药学科学技术的综合应用发展,治疗酶正在朝着研究疗效更具特色、性质更稳定、使用更安全和方便的方向快速扩展。通过酶调控机制的介导及其在细胞内的合理隔离分布,使酶以最合适的方式行使其功能和机制,从而充分发挥酶作为治疗疾病的有效工具,尤其是对那些用小分子化学药物难于治疗的疾病发挥其不可替代的作用。鉴于酶在医疗诊断中的作用越来越广泛,而

国内还没有一本这方面的专著, 在吴梧桐教授的提议下, 笔者将在即将出版的《诊断与治疗酶学》一书中, 做进一步的详细阐述。

## REFERENCES

- [1] Izzo F, Marra P, Beneduce G, *et al.* Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol*, 2004, **22**(10): 1815–1822.
- [2] Holtsberg FW, Ensor CM, Steiner MR, *et al.* Poly (ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties. *J Control Rel*, 2002, **80**: 259–272.
- [3] Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, *et al.* Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell*, 1982, **31**(1): 147–157.
- [4] Tokunaga T, Abe Y, Tsuchida T, *et al.* Ribozyme mediated cleavage of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor inhibits liver metastasis of a pancreatic cancer cell line. *Int J Oncol*, 2002, **21**(5): 1027–1032.
- [5] Ciafrè SA, Niola F, Wannenens F, *et al.* An anti-VEGF ribozyme embedded within the adenoviral VAI sequence inhibits glioblastoma cell angiogenic potential *in vitro*. *J Vasc Res*, 2004, **41**(3): 220–228.
- [6] Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T, *et al.* Ribozyme approach to down regulate vascular endothelial growth factor 189 expression in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 2000, **36**: 2390–2396.
- [7] Tokunaga T, Abe Y, Tsuchida T, *et al.* Ribozyme mediated cleavage of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor inhibits liver metastasis of a pancreatic cancer cell line. *Int J Oncol*, 2002, **21**(5): 1027–1032.
- [8] Ciafre SA, Niola F, Wannenens F, *et al.* An anti-VEGF ribozyme embedded within the adenoviral VAI sequence inhibits glioblastoma cell angiogenic potential *in vitro*. *J Vasc Res*, 2004, **41**(3): 220–228.
- [9] Kobayashi H, Eckhardt SG, Lockridge JA, *et al.* Safety and pharmacokinetic study of RPI. 4610(ANGIOZYME), an anti-VEGFR-1 ribozyme, in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, **56**(4): 329–336.
- [10] Gibson SA, Pellenz C, Hutchison RE, *et al.* Induction of apoptosis in oral cancer cells by an anti-bcl-2 ribozyme delivered by an adenovirus vector. *Clin Cancer Res*, 2000, **6**(1): 213–222.
- [11] Cheng J, Luo J, Zhang X, *et al.* Inhibition of cell proliferation in HCC-9204 hepatoma cells by a c-myc specific ribozyme. *Cancer Gene Ther*, 2000, **7**(3): 407–412.
- [12] Bi F, Fan D, Hui H, *et al.* Reversion of the malignant phenotype of gastric cancer cell SGC7901 by c-erbB-2-specific hammerhead ribozyme. *Cancer Gene Ther*, 2001, **8**(11): 835–842.
- [13] Kiehnopf M, Brach MA, Licht T, *et al.* Ribozyme-mediated cleavage of the MDR-1 transcript restores chemosensitivity in previously resistant cancer cells. *EMBO J*, 1994, **13**(19): 4645–4652.
- [14] McGrath BM, Walsh G. *Directory of Therapeutic Enzymes*. Boca Raton, Lonton, New York: Taylor & Francis Group, 2006.
- [15] Feng AJ, Yang TC, Liu G. Application and new progress of recombinant DNA technology. *Pract Med J*, 2005, **21**(17): 1978–1980.  
冯爱娟, 杨太成, 刘耘. 重组 DNA 技术的应用和新进展. *实用医学杂志*, 2005, **21**(17): 1978–1980.
- [16] Wu W, Jia Z, Liu P, *et al.* A novel PCR strategy for high-efficiency, automated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(13): 110–117.
- [17] Jia RB, Chen JH, Wu WT, *et al.* Construction and enzyme-activity assessment of L-asparaginase mutants. *Pharm Biotechnol*, 2005, **12**(4): 219–223.  
贾瑞波, 陈建华, 吴梧桐, 等. L-门冬酰胺酶突变体的构建及其活性测定. *药物生物技术*, 2005, **12**(4): 219–223.
- [18] Davis BG. Chemical modification of biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**(4): 379–386.
- [19] Liu JZ, Song HY, Weng LP, *et al.* Chemical modification of enzymes to improve their catalytic performance. *J Mol Catal*, 2002, **16**(6): 475–480.  
刘建忠, 宋海燕, 翁丽萍, 等. 化学修饰改进酶的催化特性研究进展. *分子催化*, 2002, **16**(6): 475–480.
- [20] Wang N, Ma RS. Advances in study on directed molecular evolution *in vitro* of enzyme. *Biotechnol Bull*, 2007, (2): 63–66.  
王楠, 马荣山. 酶分子体外定向进化的研究进展. *生物技术通报*, 2007, (2): 63–66.
- [21] Diaz-Ricart M, Bayes M, Bozzo J, *et al.* Lanoteplase. *Drugs Fut*, 2002, **27**(1): 21.
- [22] Diaz-Ricart M, Bayes M. Amediplase. *Drugs Fut*, 2002, **27**(6): 533.
- [23] Warmerdam PA, Plaisance S, Vanderlick K, *et al.* Elimination of a human T-cell region in staphylokinase by T-cell screening and computer modeling. *Thromb Haemost*, 2002, **87**(4): 666–673.
- [24] Vanwetswinkel S, Plaisance S, Zhi YZ, *et al.* Pharmacokinetic and thrombolytic properties of cysteine-linked polyethylene glycol derivatives of staphylokinase. *Blood*, 2000, **95**(3): 936–942.
- [25] Collen D, Sinnaeve P, Denarsin E, *et al.* Polyethylene glycol-derivatized cysteine-substitution variants of recombinant staphylokinase for single-bolus treatment of acute myocardial infarction. *Circulation*, 2000, **102**(15): 1766–1772.
- [26] Moreadith RW, Collen D. Clinical development of

- PEGylated recombinant staphylokinase (PEG-Sak) for bolus thrombolytic treatment of patients with acute myocardial infarction. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, **55**(10): 1337–1345.
- [27] Ning RX, Wang R, Cui XY. A new thrombolytic drug: recombinant human prourokinase. *Chin J New Drugs*, 2008, **17**(5): 430–432.  
宁荣霞, 王瑞, 崔晓迎. 新型溶栓药物重组人尿激酶原. *中国新药杂志*, 2008, **17**(5): 430–432.
- [28] Nie GJ, Yue WJ. Nattokinase. *Chem Life*, 2009, **29**(1): 134–137.  
聂光军, 岳文瑾. 纳豆激酶. *生命的化学*, 2009, **29**(1): 134–137.
- [29] Cao ZH. Nattokinase and its progress. *China Food Addit*, 2008, (4): 79–81.  
曹泽虹. 纳豆激酶的研究进展. *中国食品添加剂*, 2008, (4): 79–81.
- [30] Sugimoto M, Nakajima N. Molecular cloning, sequencing, and expression of cDNA encoding serine protease with fibrinolytic activity from earthworm. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, **65**(7): 1575–1580.
- [31] Izzo F, Marra P, Beneduce G, *et al.* Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol*, 2004, **22**(10): 1815–1822.
- [32] Holsberg FW, Ensor CM, Steiner MR, *et al.* Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties. *J Control Release*, 2002, **80**(1-3): 259–271.
- [33] Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, *et al.* Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 1996, **379**: 466–469.
- [34] Guo JY, Wang JH, Niu B. Clinical applications of DNase I. *J Int Pathol Clin Med*, 2009, **29**(2): 125–129.  
郭九叶, 王建华, 牛勃. DNase I 在临床中的应用. *国际病理科学与临床杂志*, 2009, **29**(2): 125–129.
- [35] Chen J, Shi YP. Target enzyme for diabetes and antidiabetic agents. *Chin J New Drugs*, 2003, **12**(7): 509–512.  
陈娟, 师彦平. 糖尿病相关的主要酶靶及其治疗药. *中国新药杂志*, 2003, **12**(7): 509–512.
- [36] Tang HF, Chen JQ, Wang P. Phosphodiesterase-4(PDE4) as a target for anti-inflammatory drug discovery: present and prospect. *J China Pharm Univ*, 2006, **37**(1): 9–13.  
汤慧芳, 陈季强, 王鹏. 磷酸二酯酶 4 作为抗炎药物靶点的研究现状及未来发展方向. *中国药科大学学报*, 2006, **37**(1): 9–13.
- [37] Seneca H, Peer P. Effect of antibacterials, antibiotics, enzymes and steroids on phagocytosis. *J Am Geriatr Soc*, 1966, **14**(3): 187–199.
- [38] Wohlman A, Syed M, Avakian S. Enhancement of drug activity by chymotrypsin. *Cell Mol Life Sci*, 1969, **25**(9): 953–954.
- [39] Chen CS, Zhao Q, Wang J, *et al.* Enhanced anti-tumor effects achieved in a murine tumor model using combination therapy of recombinant human manganese superoxide dismutase and adriamycin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **370**: 663–668.