

溶菌酶在医药中的应用及其研究进展

何金花, 刘 誉, 刘冠杰, 李琳娜, 李海成, 王丽娟
(暨南大学医学院生化教研室, 广东 广州 510632)

摘要: 溶菌酶又称胞壁质酶或N-乙酰胞质聚糖水解酶, 它能专一性的作用于目的微生物的细胞壁而不能专一性的作用于其它物质。是一种无毒, 无害安全性很高的盐基水解蛋白酶。被广泛应用于食品, 饲料, 医药等行业。本文重点介绍了溶菌酶在医药中的应用, 并展望了其发展及应用前景。

关键词: 溶菌酶; 胞壁质酶; 药理作用; 医药

中图分类号: R977.3 文献标识码: A 文章编号: 1674-229X(2008)02-0016-04

1 溶菌酶的理化性质

溶菌酶由 129 个氨基酸构成的单纯碱性球蛋白, 化学性质非常稳定。当 pH 值为 1.2 ~ 11.3 范围内剧烈变化时, 其结构几乎不变。在酸性环境中, 溶菌酶对热的稳定性很强; 当 pH 值为 4 ~ 7 100 处理 1 min 仍能保持原酶活性; 当 pH 值为 3 时能耐 100 加热处理 45 min; 在干燥条件下, 溶菌酶可以长期在室温存放, 其纯品为白色或微黄色。黄色的结晶体或无定形粉末, 无臭, 味甜。易溶于水, 遭碱易破坏, 不溶于丙酮和乙醚。

2 溶菌酶的药理作用

人溶菌酶具有多种独特而重要的药理作用。第一, 抗菌消炎。细菌的细胞壁由胞壁质组成, 胞壁质是由 N-乙酰氨基葡萄糖及 N-乙酰胞壁酸交替组成的多聚物, 胞壁残基上可以连接多肽, 称为肽聚糖。多糖以直链形式存在, 彼此邻近的多糖链之间可以通过肽链部分相互连接, 从而形成三维结构。溶菌酶专一性地作用于肽聚糖分子的 N-乙酰胞壁酸与 N-乙酰葡萄糖氨之间的 B-1, 4 糖苷键, 结果使细菌细胞壁变

得松弛, 失去对细胞的保护作用, 最后细胞溶解死亡; 溶菌酶能直接杀灭革兰阳性菌, 在分泌型免疫球蛋白补体的参与下, 还能杀灭革兰阴性菌: 如大肠埃希氏菌, 此外它还与各种诱发炎症的酸性物质结合, 使其灭活。并能增加抗生素和其他抗菌药物的疗效, 改善组织基质的黏多糖代谢从而达到抗炎和修复的目的。第二, 抗病毒。溶菌酶能与带负电荷蛋白的病毒直接作用, 并与 DNA, RNA 脱辅基蛋白结合, 并形成复合盐, 使病毒失活。第三, 增强免疫力。溶菌酶参与机体内多种免疫反应, 在机体正常防御和非特异性免疫中具有重要作用。它可改善和增强巨噬细胞吞噬消化功能, 降低细胞抑制剂导致的白细胞减少, 结合细菌脂多糖, 减轻内毒素作用, 以达到增强机体抵抗力的目的^[1]。

3 溶菌酶在治疗五官科疾病中的应用

溶菌酶是人唾液中重要的抗菌成份, 参与宿主对细菌的非免疫防御, 调节口腔环境的稳态平衡, 与抵抗口腔疾病的发生发展有一定的关系。

3.1 溶菌酶能抑制口腔龋齿的生长, 抑制菌体糖酵解和产酸, 所以多数学者认为溶菌酶对预防龋齿有一定作用。Kristala 等^[3]用田鼠实验感染 *smutans* 建立模型, 再用含溶菌酶的软膏涂布于牙齿表面, 与空白对照作比较, 发现溶菌酶有明显效果。

3.2 溶菌酶对表层性溃疡的治疗效果比深层性溃疡效果好, 对于轻型口腔溃疡, 含服溶菌酶含片即可治愈。对于口炎型和重型溃疡患者, 除了含服溶菌酶含片外, 还需加用抗生素, 维生素 B 族口服药和静脉输液, 以达到治愈目的。李瑛等^[4]用溶菌酶治疗口腔溃疡进行研究: 入选患者中轻型者 64 例, 口炎型者 14 例, 重型者 2 例, 结果轻型者 3 ~ 5 d 痊愈。口炎型者 5 ~ 7 d 痊愈, 重型者 10 ~ 12 d 痊愈。证明溶菌酶对各种类型五官科溃疡均有较显著的治疗作用。

3.3 近年来, 各种原因导致真菌感染率呈不断上升趋势, 白色念珠菌是主要致病菌。随着念珠菌株的增多, 有关抗真菌药物耐药现象的报道也逐年增加, 且有研究表明抗真菌药物有较大的副作用。目前临床上对于由白色念珠菌感染所致的小儿口腔疾病的治疗, 常用

作者简介: 何金花 (1981-), 女, 硕士, 主要从事多基因相关疾病的分子生物学研究。

抗真菌药物局部涂抹,一方面,不方便治疗;另一方面,口腔菌群失调得不到有效的纠正。因此韩剑星等^[5]收集2004.5~2005.9年间山西医科大学附属第二医院口腔科及山西省儿童医院口腔科门诊及病房的小儿口腔白色念珠菌感染的病例,用咽拭子从其口腔采集标本,并采用科玛嘉(CHROMagar)显色培养基进行白色念珠菌的分离、培养和鉴定。药敏试验以复合溶菌酶、氟康唑和制霉菌素3种药物为试验药物,研究它们对所分离的白色念珠菌的抑菌效果,采用NCCLS M27-A^[5]微量稀释法测定药物的MIC值。临床疗效观察采用随机单盲对照试验,将80例患儿病例随机分成两组:治疗组给予复合溶菌酶治疗,对照组给予制霉菌素治疗。三种药物的抗真菌药敏试验表明:复合溶菌酶、氟康唑和制霉菌素针对所分离白色念珠菌的最小抑菌浓度分别为2.03 $\mu\text{g/ml}$ 、3.19 $\mu\text{g/ml}$ 和6.03 $\mu\text{g/ml}$;白色念珠菌对复合溶菌酶的敏感性大于氟康唑和制霉菌素;临床疗效观察研究表明:复合溶菌酶治疗小儿口腔念珠菌病的有效率为97.5%,明显高于对照制霉菌素组;复合溶菌酶组的治疗时间平均为6.46 d,明显低于对照制霉菌素组的13.0 d;其研究结果表明:(1)白色念珠菌对复合溶菌酶的敏感性最高,大于氟康唑和制霉菌素。(2)复合溶菌酶用于治疗小儿口腔白色念珠菌病,疗程短,治愈率高。(3)复合溶菌酶的抗真菌体外药敏结果与临床疗效一致,表明药物敏感性与临床疗效存在一定相关性。

3.4 小儿急性鼻窦炎病因与病毒、细菌感染、及遗传因素等有密切关系。可迁延到咽、喉、中耳、眼等毗邻组织,影响患者呼吸、饮食、睡眠等生理功能。迁延不愈形成慢性鼻窦炎后,会造成患儿抵抗力下降,影响患儿的智力和面容的发育。因此,如何促进小儿急性鼻窦炎的痊愈,是医生、患者及家属共同关注的问题。柴向华等^[6]收集耳鼻喉科就诊的小儿急性鼻窦炎患者200例,发病时间3~12 w,其中男性106例,女性94例,年龄4~8岁。将研究对象随机分成研究组和对照组,每组100人,两组病人均常规给患儿使用头孢克肟片100 mg、3次/d口服,桃金娘油胶囊120 mg/次、3次/d口服研究组加用湖北威尔曼制

药有限公司生产的溶菌酶肠溶片(20片/盒,50 mg/片)每次按1.67 mg/kg、3次/d口服,对照组病例不用。其结果显示:小儿急性鼻窦炎在溶菌酶(Lysozyme)的辅助下,症状在14 d左右迅速消失,鼻黏膜恢复正常,而对照组的小儿急性鼻窦炎愈合时间明显长于研究组(20 d),显示溶菌酶(Lysozyme)有高效的辅助抗菌功能;研究组与对照组在治愈率与显效率方面均具有显著性差异,证明溶菌酶(Lysozyme)具有显著加快小儿急性鼻窦炎痊愈速度,且尚未发现不良反应,有一定的临床推广应用价值。

由于溶菌酶对五官科疾病的预防和治疗有很好的疗效,目前国内有溶菌酶含片上市,溶菌酶在治疗五官科疾病具有广阔的应用前景。

4 溶菌酶在烧伤创面感染中的应用

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)^[7]是烧伤创面感染的主要菌株之一,近年来感染发生率不断上升,由于多种抗生素和创面外用药物的使用及菌株的变异出现了MRSA及中间型抗万古霉素金黄色葡萄球菌等耐药菌株,其感染程度难以控制,导致创面不愈合。李罗珠等^[7]用复合溶菌酶治疗190例烧伤患者,烧伤创面分泌物细菌培养结果为:MRSA及中间型抗万古霉素金黄色葡萄球菌的创面200个。使用复合溶菌酶48,96 h后,对MRSA的有效率98%,100%。对中间型抗万古霉素金黄色葡萄球菌的有效率为33%,10%。复合溶菌酶对MRSA及中间型抗万古霉素金黄色葡萄球菌有显著的杀菌效果,是治疗烧伤创面感染的用药选择之一。

5 溶菌酶在抗SARS病毒中的应用

SARS冠状病毒属于单股正链RNA病毒,其RNA基因组(RNA genome)呈单链、疏松螺旋状,有序地分布在颗粒之中,病毒颗粒直径为100 nm左右,基因组约29700 bp。由于溶菌酶是碱性蛋白质,可以和RNA形成复合盐,从理论

说应该对冠状病毒有作用,所以陈冬梅等^[8]用溶菌酶联合激素抗生素及抗病毒药物对3例确诊为轻症患者和5例疑是非典型肺炎病人进行研究,在治疗结束后进行观察。结果表明:轻症SRAS感染患者中,1例WBC水平较治疗前稍升高,Sao2由治疗前的<93%提高至>95%;肺部斑片浸润性阴影缩小约15%,2例患者无明显改变,5例疑为SARS患者中有2例发热,肌肉酸痛症状者分别在第7,9 d缓解;3例头痛和其相应症状在第8 d减轻,治疗期间无1例患者发生过敏或皮疹等药物副反应。这就提示溶菌酶可能是一种安全的辅助抗SRAS治疗药物。

6 溶菌酶在治疗疱疹的应用

Camillo Bianchi等^[9]报道溶菌酶用于治疗疱疹有良好的疗效。患生殖器疱疹的病人,口服溶菌酶可显著地减少复发的次数和程度,并改善症状。国外有报道在一项有313位疱疹病人参加的研究中,患者患有带状疱疹,单纯性疱疹,卡波西水痘样疹,水痘,口腔炎,多形性渗出性红斑。这些病人口服溶菌酶1 g/d(连续服用1 w),疗效显著。该项研究也表明溶菌酶有很好的耐受性及消炎作用,同时对这个研究还指明溶菌酶对局部应用病毒性感染引起的皮肤病变有治疗作用:如寻常疣,及传染性软疣,疗效一样好,对患有带状疱疹和单纯性疱疹的老年病人也证实了口服溶菌酶的活性,还证明了这种药可增加IgG的量以增强免疫作用,它还可使血清中补体的活性正常化。

7 溶菌酶在治疗肿瘤方面的应用

Yamaokaky等^[10]对11例宫颈癌患者每天注射氯化溶菌酶(剂量为270 mg/次),连续注射3个月,同时对患者施行放疗。对照组11例宫颈癌患者施行放疗,不注射氯化溶菌酶。结果发现11例给予氯化溶菌酶治疗的患者在结束放疗后免疫参数较对照组有明显的改变:其外周白细胞总数和淋巴细胞数等并没有相应的减少,而对照组外周淋巴细胞数却相应地减少。

结果表明:氯化溶菌酶有明显增强宫颈癌患者放疗后引起白细胞减少的抑制效应,氯化溶菌酶具有提升癌症患者营养机能和明显改善肝功能的作用。氯化溶菌酶作为免疫调节剂的一种,能增强晚期宫颈癌患者的免疫能力,氯化溶菌酶作为一种辅助剂,对癌症患者的治疗疗效有促进效用。

8 溶菌酶的研究进展

8.1 周翔等^[11]采用RT-PCR的方法,从SD大鼠白细胞中成功扩增了溶菌酶基因,构建大鼠溶菌酶重组克隆质粒PMD18-T/RLYZ^[10]和大鼠溶菌酶N端多肽的重组表达质粒PLY77^[10]。通过重组大鼠溶菌酶N端基因片段在大肠杆菌ROSETTA^[10]中实现高效表达。亲和层析大量制备目的多肽LY77^[10],而且目的多肽LY77与晚期糖基化终产物具有很高的结合活性,其研究表明:原核细胞可以高效表达溶菌酶的N端多肽,而不影响原核表达系统,这不失为一种制备溶菌酶功能性多肽的有效手段,还证实该重组多肽LY77对晚期糖基化终产物具有很高的亲和力,对于进一步研究可能应用于防治糖尿病慢性并发症方面具有新的开发前景。

8.2 由于人溶菌酶具有独特的优越性和多种多样的药理作用效果,在临床上具有多种重要的应用价值,但天然人溶菌酶来源极其困难,利用DNA重组技术进行生产是解决这一难题的有效途径。

ZH CHEN等^[12]从人类胎盘中提取RNA,利用DNA重组技术,在原核生物中高效表达,通过纯化得到人溶菌酶,同时培养人胃癌细胞和肺成纤维细胞。给予不同浓度(5,10,100 μg/L)的重组人溶菌酶(recombinant human lysozymes, rHLYS)刺激细胞的生长。用MTT法检测其对两种细胞的抑止率。其结果显示:浓度为5和10 μg/L的rHLYS能够促进两种细胞的增殖,而浓度为100 μg/L的rHLYS能够明显抑制人胃癌细胞的增殖,而此浓度的rHLYS对肺成纤维细胞没有抑止作用。

由于溶菌酶在胃壁细胞和胃相关肿瘤中表达,人溶菌酶是一种重要的非特异体液免疫因子,参与机体的多种免疫反应,在机体正常防御和非特异免疫中具有重要作用。利用基

因工程重组人溶菌酶而在体外抑止人胃癌细胞的增殖,将为进一步探索rHLYS作为一种新型抗癌剂奠定了良好的基础。

8.3 C-type lysozyme(cLz)是一种对人体胃肠道黏膜分泌具有重要保护作用的抗菌酶。最近, Dasuke Jnazaki等^[13]发现一种具有抗微生物的小分子量螺旋环溶菌酶(cLz)片段,其可通过共存的蛋白酶进行生理性水解而得到,从而发挥其在体内对胃黏膜的保护作用。由于胃蛋白酶是体内重要的蛋白水解酶,它能切割肽链中的亮氨酸和苯丙氨酸的羧基连接,因此在研究中,在体外模拟新生儿胃肠环境,在无菌水中加入(mg/ml)溶菌酶和胃蛋白酶A(pepsin-A),将溶液pH值调至4,然后加入胃蛋白酶A(胃蛋白酶A与溶菌酶的比例为1:50),置于37℃环境温育24h,最终将溶液pH值调至7,此溶液体系称为pepsin-processed cLZ(Ppn-Lz)。将(Ppn-Lz)低压冻干成粉末。通过SDS-PAGE对(Ppn-Lz)进行鉴定,运用逆相HPLC分离(Ppn-Lz)得到40%的水解CLZ片断,分子量分别为7.3、5.4、4.3 kDa。通过实时动力荧光计检测水解CLZ片断对底物微球菌属膜的渗透性。其研究证实了溶菌酶在体内能被分解成各种具有生物活性的抗菌片段,共存的胃蛋白酶是一个关键的触发因素,而且其被水解的抗菌片段能以剂量依赖的形式对各种细菌发生破膜作用。其研究进一步阐明了CLZ保护胃黏膜的分子机制,为设计抗生素药物用于治疗各种传染性疾病提供新的策略^[14-17]。

9 结束语

目前临床上应用的溶菌酶主要是鸡蛋清溶菌酶,由于是一种异源蛋白,在人体内会产生免疫原性和副作用。人溶菌酶则不然,它本来是人体内的一种蛋白质,和人体具有天然相容性,人溶菌酶具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤,提高机体免疫力等优越性,因此开发新的溶菌酶资源,降低生产成本,才能促进其在实践中的应用。随着我国经济的腾飞和生物、医药技术的发展,进步。对溶菌酶的需求量也日益增多,尤其在相关疾病和恶性肿

瘤治疗中需求更显突出。可以预见,溶菌酶在21世纪发挥越来越大的作用^[18,19]。

参考文献:

- [1] 王佃亮. 重组人溶菌酶的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 9(23):59-63.
- [2] 陈强, 唐荣根. 溶菌酶在龋齿发生中的生物学作用[M]. 青岛大学医学院学报, 2003, 39(31):197-210.
- [3] Kristilav, Hakkinenp, JentchH, et al. longitudinal analysis of the accoiation of humansalivaryanents withcaries increcentand cariogenic microorganisms a two-year cohort study[J]. J.Dentres, 1998, 77(1):73-80.
- [4] 李瑛, 程文坚, 郭海霞. PE溶菌酶含片治疗老年人口腔溃疡[J]. 山西医药杂志, 1997, 26(2):190.
- [5] 韩剑星. 复合溶菌酶对小儿口腔白色念珠菌病的实验及临床研究[M]. 山西医科大学学报, 2006, 5(8):1-12.
- [6] 柴向华, 万彬, 黄应球. 溶菌酶辅助治疗小儿急性鼻窦炎效果观察[M]. 包头医学院学报, 2007, 23(3):286-287.
- [7] 李罗珠. 复合溶菌酶在烧伤创面感染中的临床应用[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 6(7):225.
- [8] 陈冬梅, 王霆. 溶菌酶的抗病毒作用及其抗艾滋病病毒作用[J]. 广东药学, 2005, 15(5):2.
- [9] CanilloBianchi. IsFleming'slysozyme analgesic agent? An experimental reappraisal of clinical data[J]. European Journal of Pharmacology, 1998, 71(23):211-221.
- [10] Yamaokaky, yoshiokat. Effects of lysozyme chloride on immune responses of patients with uterine cervical cancer [J]. Gan to kagaka kyoho, 1983, 10(8):8-20.
- [11] 周翔. 重组大鼠溶菌酶N端多肽

- 的原核表达及其对晚期糖基化终产物的结合作用[M].暨南大学学报. 2006, 27(06):785-790.
- [12] Chen ZH, Xie XD, Guo TK, et al. The anti-proliferative effects of recombinant human lysozyme on human gastric cancer cells [J]. The Journal Of International Medical Research, 2007, 35(3): 360.
- [13] Davis. Lysosomal enzymes and initiation of breast cancer [J]. Medical Hypotheses, 2005, 64(2): 288-289.
- [14] Serra C, Vizoso F, Alonso L, et al. Expression and prognostic significance of lysozyme in male breast cancer [J]. Breast Cancer Research, 2002, 4(6): 16.
- [15] Hisham R, Ibrahim, Daisuke Inazakia, Adham Abdou, et al. Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: A novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2005, 1726(1): 102-114.
- [16] L.K. Sternrauf, David Shiuan, Wen-jen Yang, et al. Lysozyme association with nucleic acids [J]. Biochemical and Biophysical Research communication, 1999, 266(2): 366-370.
- [17] Erika Silletti, Monique Willem Norde, et al. Complex formation in mixtures of lysozyme stabilized emulsions and human saliva [J]. Journal of colloid and Interface Science, 2007, 313(2): 485-493.
- [18] Sumit Chhabra, Vishal Sachdeva. Somnath Singh, et al. Influence of end groups on in vitro release and biological activity of lysozyme from phase-sensitive smart polymer-based in situ gel forming controlled release drug delivery system [J]. International Journal of pharmaceuticals, 2007, 342(2): 72-77.
- (收稿: 2007-11-16; 修回: 2008-02-01)

(上接 21 页)

3 展望

随着高分子化学、免疫学、医学、生物学等学科的不断发展和广泛的渗透、应用于新型药物给药系统中,使得口服缓控释制剂的开发和应用已日趋成熟,相信随着研究的不断深入和设备的逐步完善,高效率、自动化、智能化的口服缓控释传递系统必将不断出现。

参考文献:

- [1] 吕慧侠, 周建平. 缓、控释给药系统发展概况. 机电信息, 2004, 12: 54-58.
- [2] 管清香, 张衡弼, 林天慕. 口服缓/控释制剂研究进展. 药学实践杂志, 2002, 20(3): 159-162.
- [3] 张钧寿. 缓/控释制剂的国外研究动向. 中国新药杂志, 1996, 5(3): 161-163.
- [4] 平其能. 口服缓释及控释制剂发展动态. 药学进展, 1995, 19(3): 140-143.
- [5] 崔福德主编. 药剂学. 北京: 中国医药科技出版社, 2002, 511.
- [6] Yan G, Li HN, Zhang RH, et al. Preparation and evaluation of a sustained-release formulation of nifedipine HPMC Tablets [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2000, 26(6): 681-686.
- [7] 马萍, 祝力, 孙淑英, 等. 海藻酸钙凝胶微丸作为口服缓释给药载体的研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(6): 406-408.
- [8] 王振国, 董皎, 韩艳丽, 等. Carbopol 934p 的亲水膨胀特性及其对曲尼司特缓释片释放行为的影响 [J]. 解放军药学报, 2000, 16(3): 122-125.
- [9] 杨宗学, 凌俐, 刘胜利, 等. 复方苯巴比妥骨架缓释片的制备 [J]. 中国医院药杂志, 1998, 18(7): 313-314.
- [10] 邹梅娟, 程刚. 口服结肠定位给药系统 [J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(5): 376-380.
- [11] 钱方, 蒋雪涛, 王安文. 右美沙芬缓释微丸的研究 [J]. 第二军医大学学报, 1997, 18(2): 144-146.
- [12] 梁超峰, 欧阳允, 陈平, 等. 聚合物水性分散体在茶碱控释小丸包衣上的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2000, 1(4): 157-159.
- [13] Ramakrishna N, Mishra B. Plasticizer effect and comparative evaluation of cellulose acetate and ethylcellulose HPMC combination coatings as semipermeable membranes for oral osmotic pumps of naproxen sodium [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2002, 28(4): 403-412.
- [14] Khat tar D, Ahuja A, Khar RK Hydrodynamically balanced systems as sustained release dosage forms for propranolol hydrochloride [J]. Pharmazie, 1990, 45(5): 356.
- [15] 黄东坡, 王远, 陈军, 等. 盐酸二甲双胍胃漂浮缓释片的制备及体外释放 [J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(10): 483-486.
- [16] Liu CM, Yang HY, Xu JC. Dissolution test in vitro of Weiyoujing Tablets of hydrodynamic balance system (berberine hydrochloride) [J]. Chin Tradit Pat Med, 1998, 20(12): 3-5.
- [17] Zhang XR, Wang Y, Yin F Q, et al. Study on preparation of total salivianolic acid gastric residential tablets [J]. Chin Tradit Pat Med, 2003, 25(5): 349-350.
- [18] 莫菲, 黄雨荪. 吡啶美辛-果胶钙片结肠定位释药初探 [J]. 中国药业, 2002, 11(10): 47-48.
- [19] Tozaki H, Konoike J, Tada C, et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon [J]. J Pharm Sci, 1997, 86(9): 1016-1021.
- [20] Brondsted H, Kopecek J. Hydrogels for site-specific oral drug delivery: synthesis and characterization [J]. Biomaterials, 1991, 12(6): 584-592.
- (收稿: 2007-09-28; 修回: 2008-01-09)