

# 微生物来源的酶抑制剂研究进展\*

徐成勇 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

**关键词** 微生物源, 酶抑制剂, 筛选

**分类号** TQ465.92 **文献标识码** C **文章编号** 0001-6209(1999)02-0185-87

1958 年, 植物学家 Kohland 首先提出次生代谢的概念, 1960 年 Bu'Lock 把这一概念引进微生物学领域。微生物次生代谢物包括抗生素、色素、毒素、信息素、动植物生长促进剂和生物药物素(biopharmaceutin)等。其中生物药物素包括酶抑制剂、免疫调节剂、受体拮抗剂、激动剂、离子载体、类激素、抗氧化剂、生物表面活性剂和抗辐射药物等。

20 世纪 60 年代初, Umezawa 提出了酶抑制剂的概念, 从而将抗生素的研究扩大到酶抑制剂的新领域, 认为在微生物有机体内酶及其抑制剂是共存的, 拓展了新抗生素筛选的思路, 导致了許多新的筛选模型与方法的建立, 开创了从微生物代谢产物中寻找其他生理活性物质的新时代<sup>[1]</sup>。他从 1965 年起开展对酶抑制剂的筛选研究, 首次报道于 1969 年, 以后陆续发表了由微生物产生的各种低分子量酶抑制剂 100 多种, 推动世界各地研究机构开展类似的筛选工作, 发现了一系列化学结构各不相同而具有特定药理活性的微生物代谢产物。这些小分子酶抑制剂不仅应用于反应机理的研究和主体结构上解析, 而且对生物机体疾病分析与疾病治疗等方面都具有重要作用。<sup>[2]</sup>

## 1 国际上酶抑制剂研究概况

### 1.1 酶抑制剂微生物源

由于工作重点及实验方法所致, 已报道的酶抑制剂产物中绝大部分来自放线菌, 而且主要集中在链霉菌属, 其他属相对较少。故进一步拓宽思路, 改进实验方法, 从其他微生物种类中取得突破应是可能的。这也许就是 Omura<sup>[3]</sup>等许多学者强调的微生物来源要有新颖性和多样性的根据。多年来, 自链霉菌以外的稀有放线菌中筛选新的酶抑制剂成绩显著。也有其他微生物的报道, 如真菌<sup>[4]</sup>、细菌<sup>[5]</sup>和藻类<sup>[6]</sup>等也都发现可以产生酶抑制剂。极端环境(如高盐、高碱、高温、低温等)的微生物近来也颇引人注意。有人认为从这类微生物中筛选新产物可能有较高的命中率<sup>[7]</sup>。

由于放线菌在微生物来源中所占比重较大, 放线菌研究热点很高, 但在大多数专利文献中, 放线菌分离方法一般都是保密的, 而在生态学的文献中才偶见报道。放线菌分类的研究已达到分子生物学水平, 除了用形态和细胞壁化学组分相结合作为属的分类指征外, 还结合以分子生物学方法和数值分类方法。

### 1.2 酶抑制剂产品

1969 年 Umezawa 首先报道从链霉菌中找到低分子量酶抑制剂并预见到它们的临床用途。从此以后, 发现许多酶抑制剂在医药、护肤化妆品和农业上都有着广泛的用途。现仅介绍 3 种比较典型的酶抑制剂。

**1.2.1 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂(HMG-CoA reductase inhibitor)<sup>[8-9]</sup>**这是一类新型的降血脂药物。产品有洛伐他丁(lovastatin)、普伐他丁(pravastatin)和昔伐他丁(simvastatin)。另外, 还有

近 20 种产品可望上市。HMG-CoA 还原酶是胆固醇生物合成时的限速酶,而 HMG-CoA 还原酶抑制剂与 HMG-CoA 还原酶的底物极为相似,它们与这种酶结合,产生竞争性抑制作用,结果导致胆固醇生物合成减少,血浆胆固醇的浓度降低。同时,它作用于细胞膜 LDL 受体,使细胞膜 LDL 受体数量增加,体内 LDL 部分降解率增加,从而使血浆胆固醇浓度进一步降低。

**1.2.2  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂( $\beta$ -lactamase inhibitor)<sup>[10]</sup>:** $\beta$ -内酰胺酶抑制剂使已具有耐药性的细菌的 $\beta$ -内酰胺酶受到抑制后,抗生素不易被 $\beta$ -内酰胺酶水解,从而发挥作用。自 1976 年以来已开发上市的 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂有棒酸(clavulanic acid)、舒巴克坦(sulbactam)和他佐巴坦(tazobactam),它们分别与羟苄青霉素、替卡西林、氨苄青霉素、头孢哌酮和氧哌嗪青霉素组成的复方制剂奥格门汀(Augmentin)、替门汀(Tiamentin)、优立新(Unasyn)、舒派酮(sulperazone)与他唑西林(Tazocillin)等,增强了对耐 $\beta$ -内酰胺酶的耐药菌的作用。

**1.2.3 谷氨酰胺合成酶抑制剂(glutamine synthetase inhibitor)<sup>[11]</sup>:**谷氨酰胺合成酶的抑制导致谷氨酰胺的耗尽和硝酸盐代谢中有毒中间体的累积。在植物细胞中过量的氨有毒,因为氨很快使其叶绿体的超结构变化,引起萎黄病。已经发现谷氨酰胺合成酶抑制剂 Phosalacine 和 Oxetin 具有除草活性。

当然,色氨酸合成酶抑制剂(tryptophan synthase inhibitor)也可用作除草剂<sup>[12]</sup>,几丁质酶抑制剂(chitinase inhibitor)可用作杀虫剂和杀真菌剂<sup>[13]</sup>。

### 1.3 酶抑制剂的筛选

寻找新药取得成功基于以下诸因素:微生物分离;筛选模型的有效性;发酵条件;所需的化合物的分离<sup>[11]</sup>。其中关键在于建立有效的筛选模型。

下面举例介绍筛选模型的建立:

**1.3.1 HMG-CoA 还原酶抑制剂<sup>[14~15]</sup>:**应用酶联免疫吸附测定法将已知的 HMG-CoA 还原酶抑制剂 Compactin 与蛋白质交联,其交联物免疫动物获得抗体。酶标抗体作为“探针”在发酵液中定向寻找目的物。采用双抗体法(Sandwich ELISA)进行筛选。

**1.3.2  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂<sup>[16]</sup>:**Nitrocefin(SQ24902)是一种反应性很强的头孢菌素,易被 $\beta$ -内酰胺酶水解,颜色由黄色转变为红色,提取物或发酵液中如有抑制剂存在,Nitrocefin 颜色不变。

**1.3.3 谷氨酰胺合成酶抑制剂<sup>[11]</sup>:**发酵液如含谷氨酰胺合成酶抑制剂,则在基本培养基上能抑制枯草芽孢杆菌生长,当加入 L-谷氨酰胺时,这种抑制作用可完全被抵销。另外,在化学基本培养基上可显示出抗革兰氏阳性菌和阴性菌及某些真菌的活性,但在含谷氨酰胺的培养基上这种抗菌活性则被抵销。

## 2 国内酶抑制剂研究概况

国内酶抑制剂方面的研究始于 70 年代末,福建省微生物研究所在凝血酶抑制剂、淀粉酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂、 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂、抑胃酶剂、胃蛋白酶抑制剂、HMG-CoA 还原酶抑制剂和黑色素生物合成抑制剂等方面的研究成果显著。上海医药工业研究院在 80 年代初就开始与日本东京微生物化学研究所、日本麒麟啤酒和美国辉瑞公司等合作从土壤中寻找新的由微生物产生的生理活性物质的研究,相继建立了淀粉酶抑制剂、XIIIa 抑制剂、5 $\alpha$ -睾酮还原酶抑制剂和胆固醇生物合成酶抑制剂等的筛选模型,其中筛选获得的 HMG-CoA 还原酶抑制剂普伐他丁的菌种和工艺技术已转让给生产厂。

国内研究最为突出、最有代表性的是 HMG-CoA 还原酶抑制剂。由于 1988 年在米兰召开的胆固醇控制和心血管病的国际专题讨论会上专家们一致认为 HMG-CoA 还原酶抑制剂这类药物的发现和开发利用,是防治心血管病的一个突破性的进展;随着经济条件的改善和生活水平的提高,国内“三高”症现象日益突出,于是很多研究机构竞相进行 HMG-CoA 还原酶抑制剂的研究,如四川抗菌素工业研究所、中国医学科学院医药生物技术研究所、北京大学、无锡轻工大学等等。另外,棒酸、硫霉素和几丁质合成酶抑制剂等酶抑制剂的研究均列入国家“八五”攻关项目。

当然,国内有关酶抑制剂方面的研究基本上还是借鉴模仿国外研究,缺乏创意性的进展。

### 3 展望

尽管从 80 年代以来人们已很少能够直接从微生物代谢产物中发现具有应用价值的天然目的物,人们还是普遍认为微生物仍是能够产生新的酶抑制剂的无穷源泉。迄今为止能够从天然基质上分离出来进行人工培养的微生物菌株,仅占确知存在的微生物总数的一小部分,而通过传统的常规分离方法所获得的,往往是一些已经研究过的已知物种。微生物的分离技术近年来有了较大的提高,这主要是由于在研究中引入了数码分类的方法以后,对于已知菌株性状数据比以往大为丰富,处理数据的手段也大为增强,因而有可能根据它人的已知性状来设计样品的预处理方法、分离培养基及其培养条件,以便在分离中获得或排除某些类型的菌株。要筛选出更多的酶抑制剂,必须发展微生物的分离技术。

另外,通过建立新的筛选模型,能够发现一些已知的微生物代谢产物新的活性。从已发表的有关文献分析,只要是临床上发病机制比较明确的疾病,几乎都能应用由此建立起来的筛选模型从微生物代谢产物中发现具有相应生理活性的物质。近代生命科学,特别是分子生物学、分子病理学和分子药理学的发展,为设计理性化的筛选模型提供了实际可能。40~50 年代颇有成效的以是否能抑制某种病原物整体细胞生长来判断抗生作用筛选方法,已经让位于机理性筛选方法,这类方法能更有效地从成分极为复杂的发酵液中发现含量极少的不同生物活性物质。这种机理性筛选方法的成功设计,应该归功于近代生命科学对某些生命过程或病理过程分子机制的了解,以及所涉及的关键酶、受体、转录因子和信息传递过程的逐步揭示。因此,密切注视生命科学研究的新成果,不断设计和发展新机理性筛选方法非常重要。

### 参 考 文 献

- [1] Umezawa H. *Ann Rev Microbiol*, 1982, 36:75.
- [2] Truscheit E, Frommer W, Junge B *et al.* *Angew Chem Int Ed Engl*, 1981, 20:744.
- [3] Omura S. *Microbiol Rev*, 1986, 50:259~279.
- [4] Fredenhagen A, Petersen F, Tintelnot-Blomley M *et al.* *J Antibiot*, 1997, 50(5):395~398.
- [5] Izumida H, Adachi K, Mihara A *et al.* *J Antibiot*, 1997, 50(11):916~918.
- [6] Okino T, Matsud H, Murakami M *et al.* *Tetrahedron Lett*, 1993, 34:501~504, 8131~8134.
- [7] Hall M J. *J Biotechnol*, 1989, 7:427~438.
- [8] Kumagai H, Tomoda H, Omura S. *J Antibiot*, 1990, 43(4):397~402.
- [9] Endo a. *J Med Chem*, 1985, 28:401~405.
- [10] Howarth T T, Brown A G, King T T. *J Chem Soc Chem Commun*, 1976, 266.
- [11] Tomoda H & Omura S. *J Antibiot*, 1990, 43(10):1207~1221.
- [12] Shuto A, Ohgai M, Eto M. *Nippon Noyaku Gakkaishi*, 1989, 14(1):69~74.
- [13] Sakuda S, Isogai A, Makita T *et al.* *Tetrahedron Lett*, 1986, 27(22):2475~2478.
- [14] Raymond C Y David F M. *J Antibiot*, 1984, 37(11):1462~1468.
- [15] 何璧梅,姚国柱,张 辉等. *中国抗生素杂志*, 1993, 18(2):136~139.
- [16] Sykes R B, Wells J S. *J Antibiot*, 1985, 38:119.

## ADVANCE OF THE RESEARCH ON ENZYME INHIBITORS OF MICROBIAL ORIGIN

Xu Chengyong Zhuge Jian

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)