

# 枯草杆菌中性蛋白酶的抗炎作用

周仲达 王萍 周晓琳 (安徽省医学科学研究所, 合肥 230001)

**提要** 从枯草杆菌(A.S.1.398)的培养液中提得一种抗炎酶制剂。十二指肠40 mg/kg给药时, 对大鼠卵蛋白引起的后爪水肿有较强的抑制作用。体外试验其纤溶活性弱( $60 \mu\text{g/ml}$ , 30 min)。 $^{125}\text{I}$ 标记蛋白酶十二指肠给药证明可吸收。急性ip LD<sub>50</sub>为45 mg/kg。

**关键词** 枯草杆菌; 中性蛋白酶; 抗炎作用;  
纤溶活性

70年代初, 日本武田药厂首先从粘质赛氏(Serrati)菌的培养液中提得一种中性肽酶(serratio-peptidase), 其口服制剂名为痰净(Danzen), 具有较强的抗炎与纤溶活性, 已用于临床。中国科学院微生物研究所从枯草杆菌

的培养液中也提得一种中性肽酶<sup>(1)</sup>。本文报道它的抗炎、纤溶活性以及其它药理作用。

## 材料、方法与结果

枯草杆菌中性蛋白酶(以下简称蛋白酶)是由中国科学院微生物研究所、无锡酶制剂厂和射阳制药厂协作生产提供。粉剂为淡黄色, 无定形, 含60,000 U/g, (Folin法测定)。SP-700型UV分光光度计测定:  $280/260 = 1.4 - 1.5$ 。易溶于水, 性不稳定, 易受热、酸、碱等破坏。在pH 7.2活力最强, 保藏于低温干燥处, 临用时用蒸馏水配制。

**抗炎作用** 用体重 $250 \pm (\text{SD}) 50 \text{ g}$ 的♀♂

Tab 1. Anti-inflammatory effect of A.S.1.398 neutral protease 2 h after intraduodenal injection in rats. N = 8,  $\bar{x} \pm SD$

Protease (mg/kg)	Volume of paws (ml)	P value
0	0.68 ± 0.16	
20	0.38 ± 0.32	<0.05
40	0.27 ± 0.29	<0.01
80	0.16 ± 0.04	<0.01

大鼠，但每次试验大鼠的体重接近 ( $\pm 10$  g)，随机分组。于大鼠的上腹部作一纵行小切口，暴露十二指肠，蛋白酶直接地注入十二指肠内，注射毕缝合切口。用 10% 卵蛋白作致炎剂。在给蛋白酶后 30 min，在大鼠的一只后爪腹面 sc 卵蛋白 0.1 ml。在给蛋白酶后 120 min，测量每只大鼠二后爪的体积<sup>(2)</sup>，结果用 t 测验处理。为减少测量误差，每回测量重复 2~3 次，取其均数和降低水的表面张力，我们用 0.1% 皂溶液。

蛋白酶的抗炎作用，在初试结果的基础上 (40 mg/kg 剂量的炎症抑制率约在 40%)，选取三个剂量进行试验，结果见表 1。

蛋白酶的抗炎作用又与痰净按等量 (20,000 U) 给药作了比较，其炎症抑制率，蛋白酶为 31.1%，痰净为 34.1% ( $P > 0.05$ )。

**纤溶活性** 按文献方法<sup>(3)</sup>，取若干试管，分别加入人纤维蛋白原液 0.2 ml (1.2 mg) 和凝血酶 0.2 ml (1 U)，混合后约在 30 s 出现纤维蛋白凝块，在出现凝块后，分别加不同浓度的蛋白酶 0.1 ml，每一浓度同时做三管，对照管加 Tris-HCl 液 0.1 ml，试管置 37°C 的水浴中，经常摇动，以纤维蛋白完全溶解为终点，测定其时间。

蛋白酶在 60 μg/ml，30 min 显示纤溶活性，对照管观察 24 h 不溶解。

**吸收与分布** 用 [ $^{125}$ I] 标记蛋白酶注入家兔的十二指肠内，分别在给药后 30, 60, 120 和 240 min 采取血样，在 240 min iv 空气处死，摘出脏器，用 GP-IB 型闪烁计数仪测定其放射活性。 $[^{125}$ I] 蛋白酶的制备<sup>(4)</sup>：将蛋白酶、Na [ $^{125}$ I] 和新鲜氯胺-T (chloramine-T) 注入一

Tab 2. Distribution of [ $^{125}$ I]protease in rabbits 4 h after intraduodenal injection

Organ	cpm/g	Radioactivity of entire organ(%)
Kidneys	16,085	38.89
Liver	1,914	21.88
Duodenum	47,941	21.93
Urinary bladder	45,463	8.04
Lungs	3,132	4.48
Heart	2,168	2.16
Thyroids	164,174	1.88
Blood	8,690	0.48
Spleen	1,174	0.23

个具有橡皮塞的试管内，混合后上 sephadex G 50 柱，用 pH 7.5, 0.5 M 的磷酸缓冲液冲洗，连续、分时地收集洗脱液，以洗脱液的放射活性为依据，取蛋白酶高峰的分液部分。

血液的放射活性出现在十二指肠给药后的 30 min，其高峰时间约在 120~180 min，其在体内的分布如表 2。4 h 体内水平约为给药量的 2.5%。

此外，对试验家兔的血样还做了蛋白电泳。剪下分离的各带，用闪烁计数仪测定放射活性，发现其高峰带的部位与 [ $^{125}$ I] 蛋白酶的部位几乎一致。表明蛋白酶可由小肠吸收。

**急性毒性** 选体重  $20 \pm 2$  g 的小鼠。蛋白酶 po 剂量用到 50 g/kg 并不引起小鼠急性死亡，ip 分八个剂量组，每组 10 只小鼠，观察 24 h，按 Kärber 氏法计算半数致死量 ( $LD_{50}$ )。

ip 后，小鼠大多在 2 h 前后死亡， $LD_{50} = 45$  mg/kg，其 95% 可信限为 37—55 mg/kg。

**凝血时间测定** 选小鼠 10 只，ip 蛋白酶 5 mg/kg，用玻璃毛细管从眼球后静脉丛采血。测得给药前与给药后 1 h 的凝血时间，分别为  $1.4 \pm 0.4$  min 与  $1.5 \pm 0.4$  min，二者均在正常范围之内。

## 讨 论

已证明多种抗炎酶制剂能从小肠吸收。用同位素示踪技术证明枯草杆菌中性蛋白酶在肠道内也是可吸收的。给药后 4 h 的体内水平低

于菠萝蛋白酶(Smyth, 1964),除制剂不同外,因为该酶在肾组织中的水平较高,排泄快可能为其部分原因。从现有的实验数据看,蛋白酶的抗炎作用与痰净接近,但痰净的纤溶活性(2 μg/ml)比蛋白酶强约30倍,结合它们来自不同菌株,推想该酶可能是不同于痰净的另一种酶制剂,尚待化学研究加以证实。蛋白酶的急性毒性低于菠萝蛋白酶(ip LD<sub>50</sub> = 37 mg/kg),它低毒的原因似与菌株有关。

**致谢** 淮南第二矿工医院同位素室协助完成同位素工作

## 参 考 文 献

- 1 邱秀宝、任永娥、程秀兰、崔福绵、徐大雅、李万年、孙世章、李禄先. 微生物学报 1982年6月; 22 (2): 169
- 2 Kopf R, Nielsen IM. *Arzneim Forsch* 1958 Mar; 8 (3): 154
- 3 Kaulla KN von, Schultz RL. *Am J Clin Pathol* 1958 Feb; 29 (2): 104
- 4 Greenwood FC, Hunter WM. *Biochem J* 1963 Oct; 89 (1): 114
- 5 Smyth RD, Brennan R, Martin GJ. *Exp Med Surg* 1964 Mar; 22 (1): 46

*Acta Pharmacologica Sinica* 1983 Sep, 4 (3) : 214-216

## ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF *BACILLUS SUBTILIS* NEUTRAL PROTEASE

ZHOU Zhong-da, WANG Ping, ZHOU Xiao-lin

(Institute of Anhui Medical Sciences, Hefei 230001)

**ABSTRACT** A neutral peptidase was isolated from *Bacillus subtilis* (A.S. 1.398). Intra-duodenal injection of this protease 40 mg/kg showed a significant anti-inflammatory effect on acute egg albumin-induced edema of hind paws in rats and a weak fibrinolytic activity (60 μg/ml) *in vitro*. The [<sup>125</sup>I]protease by intra-duodenal injection was absorbable from

small intestine. Acute ip LD<sub>50</sub> in mice was 45 (95% fiducial limits 27 and 55) mg/kg. Hence this protease has a low toxicity, strong anti-inflammatory effect.

**KEY WORDS** *Bacillus subtilis*; neutral protease; anti-inflammatory agents; fibrinolytic activity