

透明质酸酶的研究现状及展望

吴剑英, 陈奕涵*

(上海昊海生物科技股份有限公司, 上海 201613)

摘要: 随着分子生物学和蛋白质组学的发展, 不同来源的透明质酸酶多样性逐渐被发现, 已逐渐应用于医药和工具酶等多个领域。综述了透明质酸酶分类与来源、透明质酸酶抑制剂、应用领域和重组透明质酸酶的制备, 并对其未来研究方向进行了展望。

关键词: 透明质酸酶; 分类; 来源; 抑制剂; 重组透明质酸酶

中图分类号: TQ464

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2014)05-0047-06

Research status and prospect of hyaluronidase

WU Jian-ying, CHEN Yi-han*

(Shanghai Haohai Biological Technology Co., Ltd., Shanghai 201613, China)

Abstract: With the development of molecular biology and proteomics, different hyaluronidases are gradually applied to the fields of medicine and instrumental enzyme. The classification, sources and preparation of hyaluronidases, hyaluronidase inhibitor and recombinant hyaluronidase are reviewed. The research directions in the future are prospected as well.

Key words: hyaluronidase; classification; source; inhibitors; recombinant hyaluronidase

透明质酸酶(hyaluronidase, HAase)是能降解胞外黏多糖透明质酸(hyaluronic acid, HA)的一种糖苷酶, 不同来源的HAase作用效果不尽相同, 部分HAase也可以在一定程度上降解软骨素和硫酸软骨素^[1]。

HA是由N-乙酰氨基葡萄糖与D-葡萄糖醛酸为双糖单位等摩尔聚合而成的胞外黏多糖, 其双糖单位中的N-乙酰氨基葡萄糖与D-葡萄糖醛酸以 β -1,3糖苷键相连, 双糖单位之间则以 β -1,4糖苷键进行聚合^[2]。基于HA结构特性, HAase通过水解HA链中 β -1,3糖苷键或者 β -1,4糖苷键得到小分子HA或者寡糖, 从而降低了HA的黏滞性和润滑性, 以致于增强了细胞的通透性, 减弱了宿主细胞的物理防御屏障进而有利于细菌、毒素以及营养物质的扩散^[3], 临床医学上HAase还可以用于药物渗透剂、麻醉辅助剂、手术后消肿剂等^[4]。

近年来, 随着HA已被广泛应用于医药、化妆品和食品领域, HAase亦逐渐成为HA相关领域研究热点之一, 然而HAase终究碍于组织来源不易以及分离纯化困难等因素, 过去一段时间并没有得到很好的研究^[5]。鉴于HAase国内外的研究现状, 本文中主要对其分类、性质、酶活测定以及应用领域进行综述, 以期HAase的研究提供交流与借鉴。

1 HAase 的分类与来源

1.1 HAase 的分类

分子遗传学理论表明, HAase可分为2大家族: 原核生物透明质酸酶和真核生物透明质酸酶。根据HAase催化机理和底物特异性的不同其主要可以分为以下3类(图1)。

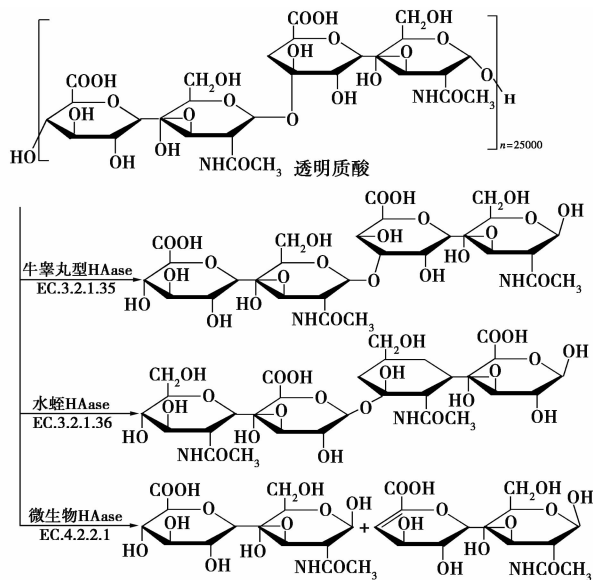


图1 透明质酸酶的分类

收稿日期: 2013-12-04

基金项目: 上海市科促会联盟项目(LM201123); 上海市科委产学研医项目(11DZ1921405)

作者简介: 吴剑英(1964-), 男, 硕士, 主治医师, 高级经营师, 从事医药产品的研究与应用工作; 陈奕涵(1987-), 男, 硕士, 助理工程师, 研究方向为生物化工及基因工程, 通讯联系人, 021-57748039, chenyhok1987@126.com。

(1) 透明质酸-4-聚糖水解酶 (EC3. 2. 1. 35): 主要来源于哺乳动物睾丸、动物毒液及溶酶体, 为内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 并伴有转糖苷酶活性, 通过作用于 β -1, 4 糖苷键可以将 HA 降解为四糖, 同时也可以将软骨素和硫酸软骨素降解为四糖。依据碳水化合物活性酶数据库 (CAZY) 酶学分类标准, 哺乳动物 HAase 属于糖苷水解酶 56 家族^[6], 它对于内切 HA 的 β -1, 4 糖苷键具有随机性, 同时伴随着生成聚合度减少若干单位的全新 HA 链, 由于裂解过程需要同时释放出多个四糖, 哺乳动物 HAase 尚具有转糖苷酶活性, 从而可以更加及时地转移裂解后的四糖, 直到完全生成最终的四糖产物。

(2) 透明质酸-3-聚糖水解酶 (EC3. 2. 1. 36): 主要来源于水蛭与十二指肠虫, 属内切- β -葡萄糖醛酸苷酶, 通过作用 β -1, 3 糖苷键可以特异性降解 HA 为四糖或者己糖, 不能降解软骨素和硫酸软骨素。

(3) 透明质酸裂解酶 (EC4. 2. 2. 1): 微生物来源的 HAase 分布于细菌、病原真菌以及噬菌体中, 既可降解 HA 也可作用于软骨素和硫酸软骨素, 通过 β -1, 4 糖苷键断裂和 β -消去作用可以获得 4, 5-不饱和双糖。细菌 HAase 与哺乳动物 HAase 由于属于不同的 CAZY 家族, 其降解 HA 的过程大不相同^[7], 它内切 HA 的 β -1, 4 糖苷键具有严格的顺序性, 每次内切作用仅仅释放出 1 个单位双糖, 并且伴

随着对侧链基团外切修饰作用, 同时生成减少 1 个双糖单位的全新 HA 链, 整个降解过程非常有序, 直到最终得到 4, 5-不饱和双糖。

1.2 HAase 的来源

HAase 在自然界中的分布比较广泛, 已被发现存在于哺乳动物、无脊椎动物 (甲壳类、水蛭和昆虫)、病原真菌 (念珠菌属、链霉菌属) 以及细菌中。对于哺乳动物 HAase 研究表明, 不同种类哺乳动物来源的 HAase 不同, 同一哺乳动物不同组织部位来源的 HAase 也不同。蛇、黄蜂、蝎子、蜥蜴等动物毒液以及水蛭中也含有 HAase, 故在发起进攻时可以加强其毒液在受害者局部组织间的渗透和扩散^[8]。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 已经在链球菌、葡萄糖球菌、肠球菌、厌氧型杆菌以及链霉菌属中发现 HAase 同源性氨基酸序列。

1.2.1 人类 HAase

人类的基因组序列表明人的 HAase 具有 6 个成员基因, 其中 HYAL-1、HYAL-2 和 HYAL-3 3 段基因紧密地定位于染色体 3p21.2, 另外 3 段基因 HYAL-4、HYAL-P1 和 PH-20 紧密地定位于染色体 7q31.3, 然而 6 个亚型基因的序列相似性高达 33% ~ 44%, 形成的原因可能与古老的基因复制过程有关^[9]。HYAL-1 主要分布于哺乳动物的血浆和尿液中, 肝脏、肾、脾以及心脏中也发现有表达, 但含量水平很低且分离纯化比较困难, 近年发展的基

(上接第 46 页)

[21] Ren N Q, Guo W Q, Wang X J, *et al.* Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33 (16): 4318 - 4324.

[22] Liu Z, Lv F, Zheng H, *et al.* Enhanced hydrogen production in a UASB reactor by retaining microbial consortium onto carbon nanotubes (CNTs) [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012, 37 (14): 10619 - 10626.

[23] Peixoto G, Saavedra N K, Varesche M B A. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36 (15): 8953 - 8966.

[24] Kim E J, Lee M K, Kim M S, *et al.* Molecular hydrogen production by nitrogenase of *Rhodobacter sphaeroides* and by Fe-only hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum* [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33 (5): 1516 - 1521.

[25] Hay J X W, Wu T Y, Juan J C, *et al.* Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen

usage [J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2013, 7 (3): 334 - 352.

[26] Zheng G H, Kang Z H, Qian Y F, *et al.* Biohydrogen production from tofu wastewater with glutamine auxotrophic mutant of *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Water Dynamics*, 2008, 987 (143): 143 - 148.

[27] Lin C Y, Lay C H, Sen B, *et al.* Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012, 37 (20): 15632 - 15642.

[28] Fang H H P, Liu H, Zhang T, *et al.* Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2005, 30 (7): 785 - 793.

[29] Chen C Y, Yang M H, Yeh K L, *et al.* Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33 (18): 4755 - 4762.

[30] Jung K W, Moon C, Cho S K, *et al.* Conversion of organic solid waste to hydrogen and methane by two-stage fermentation system with reuse of methane fermenter effluent as diluting water in hydrogen fermentation [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 139: 120 - 127. ■

质凝胶分析系统使得从人血浆和尿液中分离纯化 HYAL-1 成为可能,已成功从人血浆中获得了一种分子质量 57 kDa 的 HYAL-1,而从人尿液中获得了 2 种 HYAL-1^[10],分子质量分别为 45 kDa 和 57 kDa,研究表明,2 种 HYAL-1 为一组同工酶,不同的是低分子质量 HYAL-1 包含 2 个不同的 N 端序列。HYAL-2 除了在大脑中没有被发现其表达之外,其他许多组织部位都发现其存在, HYAL-1 和 HYAL-2 在体内主要通过协同作用负责细胞内外 HA 的分解代谢,发育早期对胞外 HA 的降解有利于软骨组织细胞的分化。由于现有的酶活检测方法表明 HYAL-3 没有生物活性,迄今为止对其催化性能研究较少。人 HYAL-4 是第一个被确认在脊柱动物组织中发现的软骨素酶,主要存在于胎盘和骨骼肌中,研究表明,其对 HA 无生物活性。人 HYAL-P1 由于在进化过程出现中一段外显子缺失,从而导致氨基酸翻译过程提前终止,使其成为一段假基因,而鼠 HYAL-P1 基因序列表明,其没有发生外显子的缺失突变,综合对比结果猜测鼠或者别的动物可能具有活性 HYAL-P1。研究表明,PH-20 是一种多功能膜蛋白,既具有降解 HA 的作用又具有提供 HA 诱导信号受体的作用^[11],存在于人睾丸、女性生殖道、胎盘组织和某些恶性肿瘤中,但是人体不同部位来源的 PH-20 性质以及生物活性是不完全相同的,形成这种差别的原因可能是不同部位细胞生理条件不一样,影响了酶活性区域内氨基酸的折叠和糖基化。

1.2.2 微生物 HAase

许多微生物都能产生透明质酸酶,包括噬菌体,但是噬菌体 HAase 分子质量比细菌 HAase 要小,并且在胞外环境下检测到其 HAase 生物活性很低^[12]。革兰氏阳性菌可以将胞内 HAase 分泌至胞外环境中,研究表明,所有具有分泌 HAase 机制的革兰氏阳性菌都具备感染动物的能力^[13],这些菌类有链球菌、葡萄球菌、消化链球菌属、丙酸菌属、链霉菌属、梭状芽孢杆菌等。革兰氏阴性菌也可以产生 HAase 但不分泌至胞外环境,故很少致病,这些菌类有气单胞菌属、弧菌、梭菌属、变形杆菌属等。

1.2.3 其他来源 HAase

睾丸 HAase 和毒液 HAase 作为一种“扩散因子”已经在医学领域应用多年,可以促进皮下注射的药物更好地扩散。工业上制备睾丸 HAase 主要采用哺乳动物牛、羊睾丸作为组织来源,通过提取、

盐析、精制等步骤最终得到 HAase 精品,研究表明^[11],提取得到睾丸 HAase 主要来自于膜蛋白 PH-20,属于透明质酸-4-聚糖水解酶。毒液 HAase 通过降解 HA 和胞外基质使得毒液可以较快地从受伤部位扩散进入神经系统,通过氨基酸同源性对比分析,结果表明大多数毒液 HAase 与哺乳动物 PH-20 同源性达到 36%^[8],但是碍于毒液 HAase 的特殊性,一直并没有得到很好的研究,随着分子生物学的进步,相信毒液 HAase 研究可以得到进一步的发展。水蛭 HAase 主要来源于水蛭头部部位的提取^[14],可以特异性降解 HA 而不能降解其他多糖,临床上水蛭 HAase 常常用于心血管疾病的治疗。

2 HAase 抑制剂的研究

HAase 被确认在许多生理和病理过程中发挥着关键的作用,如细胞胚胎发生、血管生成、炎症病情恶化、伤口愈合、细菌致病、毒素或者毒液的扩散过程,因此,识别并且研究透明质酸酶抑制剂具有实际意义。HAase 抑制剂主要来自蛋白质、糖胺多糖、植物中提取的生物活性成分和有机合成的化合物。来自小鼠血清 HAase 抑制剂是一个分子质量在 120 kDa 的耐热糖蛋白^[15],最佳抑制活性 pH 为 6~8,可以明显地抑制牛睾丸 HAase、蛇 HAase 和蜂毒 HAase,抑制过程中表现出对镁离子的绝对依赖和蛋白酶的敏感,但对链霉菌 HAase 则无抑制效果。肝素^[16]是由葡糖醛酸-2-硫酸和 N-磺基-D-葡糖胺-6-硫酸通过 α -1,4 糖苷键交替连接形成平均分子质量为 15 kDa 的酸性黏多糖硫酸脂,抑制过程中它不与 HAase 活性区域结合,是一种非竞争性抑制剂,可以抑制睾丸 HAase、毒液 HAase 而不能抑制水蛭 HAase 和细菌 HAase,其中抑制睾丸 HAase 效果优于毒液 HAase。Isoyama 等^[17]通过对 21 种 HAase 抑制剂进行研究,认为苯乙烯-4-磺酸和 HA 硫化衍生物为最有效的 HAase 抑制剂,其中哺乳动物 HYAL-1 和蜂毒 HAase 比睾丸 HAase 更敏感,而链霉菌 HAase 除了对聚苯乙烯磺酸敏感外对其他的抑制剂都不敏感。Girish 等^[18]认为壳聚糖可以抑制毒液 HAase 和睾丸 HAase 对 HA 的降解作用,壳聚糖是一种带正电荷的聚葡萄糖胺(1-4)-2-氨基-B-D 葡萄糖衍生物,壳聚糖的 NH_3^+ 与 HA 分子中 COO^- 通过静电作用形成复合 HA,从而保护 HA 免于被 HAase 降解,壳聚糖的抑制效率与其分子质量有直接关系,抑制效果随着壳聚糖分子质量的增大

而增强,可以显著增强 HA 制剂在体内的给药效果和延长药效时间。Okorukwu 等^[19]认为对于肺炎链球菌 HAase 较好的抑制剂则是维生素 C,它通过与 HAase 活性区域的 25 个氨基酸残基结合而抑制 HAase 的活性。蝶豆植物叶提取物具有抗炎、局部麻醉和抗糖尿病的作用, Maity 等^[20]研究表明,蝶豆植物叶提取物中蒲公英赛醇可以抑制睾丸 HAase,在抗肿瘤、抗氧化以及抗炎领域都可以发挥积极作用;其他植物来源的 HAase 抑制剂也有植物提取的黄酮、罗望子种子提取的抗氧化剂成分、生物碱等生物活性物质,如何从植物中进行 HAase 抑制剂提取和纯化则是天然来源 HAase 抑制剂未来研究的方向。近年来已完成重组 HAase 在大肠杆菌体内表达,然而大肠杆菌在表达 HAase 过程中容易形成包涵体, Akhtar 等^[21]研究认为盐酸胍和 L-精氨酸在很低浓度下会完全抑制链球菌 HAase 酶活,对重组 HAase 包涵体复性工艺有较好的提示作用。

3 HAase 的应用

HAase 通过降解 HA 可增加细胞膜的通透性、降低细胞外环境的黏度,增强药物制剂在胞内扩散作用等,参与体内多种机体生理代谢和生化反应,同时还可以作为工具酶参与 HA 与硫酸软骨素等多糖的降解。

临床研究表明,肿瘤细胞和肿瘤间质细胞都可以分泌 HA,而肿瘤细胞还可以分泌 HAase 用来对正常细胞进行侵袭攻击,对膀胱癌和前列腺癌Ⅱ期和Ⅲ期患者尿液检测得出 HAase 含量高于正常人 3~7 倍,临床统计研究表明,HAase 含量检测具有较高的灵敏性和特异性,可以作为肿瘤标记物并为早期癌症的诊断提供依据^[22]。睾丸 HAase 自 20 世纪已经用作化疗患者使用药物的扩散辅助剂,在基础临床研究阶段,HAase 已被证明可以增强长春碱在恶性黑色素瘤、膀胱癌、卡波西氏肉瘤和脑瘤治疗中的药效^[23]。采用腺病毒载体基因治疗神经系统疾病是近年发展的新技术, Wanisch 等^[24]研究表明,基因治疗的关键在于腺病毒载体能否成功转导进入神经元细胞,而体内外研究发现腺病毒载体转导进入神经元细胞效率很低,主要原因是细胞外基质的主要成分 HA 在神经元细胞周围形成密集的神经网络,阻止外源物质进入细胞,而 HAase 作为安全可靠的辅助剂已被证实对人体无副作用,它与腺病毒载体合之后可以极大程度地提高对神经元细胞的

转导率,使得基因治疗神经系统疾病更加有效。将眼内激光应用于玻璃体切割术是 20 世纪 70 年代初发展起来的高水准现代显微眼科手术,在手术过程中 HAase 常和麻醉剂一起并用,玻璃体黏液中的 HA 通过与蛋白质结合形成蛋白多糖,在维持玻璃体凝胶稳定性方面起着举足轻重的作用,通过 HAase 对 HA 以及其他的酸性黏多糖基质的降解,使得玻璃体从凝胶状态变为溶胶状态,多个较小的液化腔也融合成一个较大的液化腔,增加了红细胞和渗出吞噬细胞的扩散速度,进而增强了血红细胞溶菌作用和吞噬作用,提高了眼内激光手术的效率 and 安全性,减少了白内障、眼内炎、视网膜出血、撕裂或脱落等手术并发症的发生^[25]。另外,在整形美容领域,HAase 也常被用于面部注射 HA 除皱后不良反应的后处理^[26]。

4 重组 HAase 的制备

随着 HAase 在医药领域的应用逐渐被公众所认可,2004 年以来,美国 FDA 相继批准了 3 种透明质酸酶制剂——牛型 HAase (Amphadase)、羊型 HAase (Vitrax) 和重组人 rHuPH-20 (Hylenex) 上市,市售价格以重组人 rHuPH-20 (Hylenex) 最为昂贵,适应症包括增进其他药剂的吸收和扩散、经皮泌尿系统造影辅助和增进造影剂的再吸收,目前除 FDA 标注外还可以用于透明质酸注射副反应的矫正。现阶段 HAase 制备方法有提取法、发酵法和基因工程法。

4.1 提取法

主要采用哺乳动物睾丸、动物毒液和鱿鱼软骨组织作为来源材料,而美国 FDA 从 1998—2011 年收到 98 例患者不良反应报告,主要原因在于动物源性 HAase 交叉感染。

4.2 发酵法

发酵法目前已有采用缓症链球菌 MTCC2695 作为表达菌株^[27],但是所采用的生产菌株是致病菌,发酵过程中不可避免地形成内毒素和溶血素,现阶段仅仅适应于基础研究或者用于 HAase 工具酶领域。

4.3 基因工程法

近年来基因工程的发展使得多种来源 HAase 得到了进一步研究,已在大肠杆菌、毕赤酵母、昆虫细胞和植物细胞中完成重组 HAase 的表达。Berry 等^[28]将重组肺炎链球菌 hyl 基因在大肠杆菌胞内

表达,最终通过琼脂糖凝胶柱粗分离后得到 764 000 U/mg 的 HAase。Guo 等^[29]采用大肠杆菌表达重组兽疫链球菌 hyl 基因可以获得 HAase,经过复性和纯化最终可以得到 3 800 U/mg 的 HAase。本研究组也采用 C 型的马疫链球菌 hyl 基因与温敏型表达载体重组,然后在大肠杆菌胞内表达,经过复性和镍柱纯化后获得高活性 HAase。Yang 等^[12]采用重组化脓链球菌噬菌体 hyl 基因在大肠杆菌胞内表达,采用镍柱纯化得到粗酶活大致在 9.46 U/mg,远低于上述的研究结果。形成这种差异原因可能是噬菌体 HAase 对宿主细胞依赖性较强,在体外条件下容易失活,而且噬菌体 HAase 降解 HA 机制与细菌 HAase 也不同。毕赤酵母对外源蛋白具有表达量高并且活性高,又可以选择分泌型表达,是表达真核 HAase 的较佳宿主,Reitinger 等^[30]将蜜蜂毒液 HAase 基因重组于毕赤酵母,纯化后得到的重组 HAase 酶活效力和天然蜜蜂 HAase 并无差异,借助于基因重组技术,不同动物的毒液 HAase 性质未来将可以得到进一步的阐述。Hofinger 等^[31]分别将人 HYAL-1 基因在昆虫细胞和大肠杆菌进行表达,结果表明,人 HYAL-1 基因在大肠杆菌胞内形成了大量的包涵体,体外复性纯化后酶活仅为 0.1 U/mg,而采用果蝇细胞作为宿主表达 HYAL-1 活性达到 8.6 U/mg。Jung 等^[32]借助农杆菌将人 HYAL-1、HYAL-2、HYAL-3 和 HYAL-4 基因分别转入到烟草本塞姆氏细胞中进行表达,叶片组织中提取得到的可溶蛋白经过镍柱纯化后其酶活分别为 63.07、25.57、2.38、0.08 U/mg,而在大肠杆菌中表达上述 4 段基因都无活性蛋白,HAase 在植物细胞中的表达成功为未来制备天然重组 HAase 提供了新渠道。鉴于哺乳动物 HAase 与细菌 HAase 氨基酸同源性差异较大,大肠杆菌更适宜于表达原核生物 HAase,而表达真核生物 HAase 容易形成包涵体,由于大肠杆菌缺乏对真核蛋白的糖基化修饰功能,即使体外包涵体成功复性后得到的重组哺乳动物 HAase 仍活性较低;而毕赤酵母在表达真核生物目的蛋白具有修饰功能,使其表达活性较高,并且毕赤酵母还具有易于高密度发酵培养和培养成本低廉等优点,是大规模制备重组人 HAase 的首选方法。

5 展望

随着 HA 代谢机制和应用领域研究的深入,HAase 已逐渐成为国内外学者研究的重要课题,自

然界中广泛分布的特点决定其来源多样性,近年来,借助分子生物学手段已经在多种来源的 HAase 研究方面取得一些进展,这将有助于推动 HAase 在结构、生化性质和应用 3 个方面进行如下深入研究。

(1)结构方面:根据 HAase 基因保守序列分析,克隆出更多来源的 HAase 基因,结合结构生物学方法可以对表达纯化后的 HAase 进行立体结构研究,并采用 X-射线衍射分析法获知 HAase 活性位点信息。

(2)生化性质:不同来源 HAase 氨基酸序列差异反映在 HAase 生化性质则差异很大,如体现在等电点、底物特性、催化特性等方面。近期发现产紫青霉 HAase 基因以及氨基酸同源性序列分析表明,其不属于现有国际酶学会关于 HAase 的分类^[33],与此同时,注重 HAase 抑制剂与致病菌侵袭能力之间的研究,如何更加完善地去阐述 HAase 生化性质的多样性则是未来其应用研究的基础。

(3)应用研究:HAase 作为肿瘤理想标记物已具有临床统计学数据支持,如何将 HA/HAase 诊断用于肿瘤前期特异性检测是医学界面临的新课题。随着 HA 领域研究深入,寡聚 HA 有别于普通 HA 的生物作用已引起人们的重视,借助基因重组技术完成多种重组 HAase 制备以及将其应用于医用 HAase 原料和酶解法制备寡糖 HA 则是未来产业化研究的重点。

参考文献

- [1] El-Safory N S, Fazary A E, Lee C K, *et al.* Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 81: 165 - 181.
- [2] 陈奕涵, 钱悦, 候永泰, 等. 大肠杆菌 UDP-葡萄糖脱氢酶基因的克隆、表达及酶活性测定 [J]. *生物技术通报*, 2013, 252(7): 136 - 143.
- [3] Allen C H, Etwiler L S, Miller M K, *et al.* Recombinant human hyaluronidase-enabled subcutaneous pediatric rehydration [J]. *Journal of the American Academy of Pediatrics*, 2009, 124(5): 858 - 867.
- [4] Brown M B, Jones S A. Hyaluronic acid: A unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin [J]. *European Academy of Dermatology and Venereology JEADV*, 2005, 19: 308 - 318.
- [5] Girish K S, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview [J]. *Life Sciences*, 2007, 80: 1921 - 1943.
- [6] Hofinger E S, Hoehstetter J, Oettl M, *et al.* Isoenzyme-specific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases [J]. *Glycoconj*, 2008, 25: 101 - 109.
- [7] Jedrzejas M J, Mello L V, Groot B L. Mechanism of hyaluronan deg-

- radation by *streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 31 (277) : 28287 - 28297.
- [8] Jacomini D L J, Pereira F D C, Dos Santos P, et al. Hyaluronidase from the venom of the social wasp polybiapaulista (hymenoptera, vespidae) : Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis [J]. Toxicon, 2013, 6: 70 - 80.
- [9] Csoka A B, Frost G I, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes [J]. Matrix Biology, 2001, 20: 499 - 508.
- [10] Csóka T B, Frost G I, Wong T, et al. Purification and micro sequencing of hyaluronidase isozymes from human urine [J]. FEBS Letters, 1997, 417: 307 - 310.
- [11] Cherr G N, Yudin A I, Overstreet J W. The dual functions of GPI-anchored PH-20: Hyaluronidase and intracellular signaling [J]. Matrix Biology, 2001, 20: 515 - 525.
- [12] Yang P F, Lee C K. Purification of recombinant hyaluronan lyase of streptococcus pyogenes bacteriophage H4489A expressed in escherichia coli and its application for the specific determination of hyaluronan concentration [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 65: 159 - 164.
- [13] Makris G, Wright J D, Ingham E, et al. The hyaluronate lyase of staphylococcus aureus-a virulence factor? [J]. Microbiology, 2004, 150: 2005 - 2013.
- [14] Abdullah S, Dar L M, Rashid A, et al. Hirudotherapy/Leech therapy: Applications and indications in Surgery [J]. Archives of Clinical, 2012, 1: 172 - 180.
- [15] Mio K, Carrette O, Maibach H I, et al. Evidence that the serum inhibitor of hyaluronidase may be a member of the inter-alpha-inhibitor family [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 32413 - 32421.
- [16] Maksimenko A V, Petrova M L, Tischenko E G, et al. Chemical modification of hyaluronidase regulates its inhibition by heparin [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001, 51: 33 - 38.
- [17] Isoyama T, Thwaites D, Selzer M G, et al. Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases [J]. Glycobiology, 2006, 1 (16) : 11 - 21.
- [18] Girish K S, Kemparaju. A low molecular weight isoform of hyaluronidase: Purification from indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization [J]. Biochemistry (Moscow), 2005, 6 (70) : 708 - 712.
- [19] Okorokuwu O N, Vercruyse K P. Effects of ascorbic acid and analogs on the activity of testicular hyaluronidase and hyaluronan lyase on hyaluronan [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003, 4 (18) : 377 - 382.
- [20] Maity N, Nema N K, Sarkar B K, et al. Standardized clitoria ternatea leaf extract as hyaluronidase, elastase and matrix-metalloproteinase-1 inhibitor [J]. Indian Journal of Pharmacology, 2012, 5 (44) : 584 - 588.
- [21] Akhtar S, Bhakuni Vinod. Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase contains two noncooperative independent folding/unfolding structural domains [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 28 (278) : 25509 - 25516.
- [22] Lokeshwar V B, Selzer M G. Hyaluronidase: Both a tumor promoter and suppressor [J]. Seminars in Cancer Biology, 2008, 18: 281 - 287.
- [23] Guedan S, Rojas J J, Gros A, et al. Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth [J]. Molecular Therapy, 2010, 7 (18) : 1275 - 1283.
- [24] Wanisch K, Kovac S, Schorge S. Tackling obstacles for gene therapy targeting neurons: Disrupting perineural nets with hyaluronidase improves transduction [J]. Hyaluronidase Facilitates Neuronal Transduction, 2013, 1 (18) : 1 - 11.
- [25] Silverstein S M, Greenbaum S, Stern R. Hyaluronidase in ophthalmology [J]. The Journal of Applied Research, 2012, 1 (12) : 1 - 13.
- [26] Maurizio Cavallini M D, Riccardo Gazzola M D, Marco Metalla M D, et al. The role of hyaluronidase in the treatment of complications from hyaluronic acid dermal fillers [J]. Aesthetic Surgery Journal, 2013, 33 (8) : 1167 - 1174.
- [27] Mahesh N, Balakumar S, Parkavi R, et al. Optimization and production of hyaluronidase by streptococcus mitis MTCC 2695 [J]. Biomolecules, 2012, 1 (1) : 1 - 4.
- [28] Berry A M, Lock R A, Thomas S M, et al. Cloning and nucleotide sequence of the streptococcus pneumoniae hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant escherichia coli [J]. Infection and Immunity, 1994, 3 (62) : 1101 - 1108.
- [29] Guo X P, Liu F, Zhu X Q, et al. Expression of a novel hyaluronidase from Streptococcus zooepidemicus in escherichia coli and its application for the preparation of HA oligosaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77: 254 - 260.
- [30] Reitinger S, Boroviak T, Laschober G T, et al. High-yield recombinant expression of the extremophile enzyme, bee hyaluronidase in pichia pastoris [J]. Protein Expression and Purification, 2008, 57: 226 - 233.
- [31] Hofinger E S A, Spickenreither M, Oschmann J, et al. Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: Insect cells versus escherichia coli as expression system and identification of low molecular weight inhibitors [J]. Glycobiology, 2007, 4 (17) : 444 - 453.
- [32] Jung Y, Jung M Y, Park J H, et al. Production of human hyaluronidase in a plant-derived protein expression system: Plant-based transient production of active human hyaluronidase [J]. Protein Expression and Purification, 2010, 74: 181 - 188.
- [33] Bakke M, Kamei J I, Kamei A. Identification, characterization, and molecular cloning of a novel hyaluronidase, a member of glycosyl hydrolase family 16, from Penicillium spp [J]. FEBS Letters, 2011, 585: 115 - 120. ■