

豆豉溶栓激酶 DCK 的体内溶栓抗栓作用

贺欢¹, 张硕², 张敏¹, 印酬¹, 张茜¹, 高秀丽^{1*}, 张荣平^{3*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学实验动物中心, 贵阳 550004;
3. 昆明医科大学药学院, 昆明 650500)

[摘要] **目的:**探讨贵州豆豉溶栓激酶 DCK(DCK 酶)的体内溶栓抗栓作用及其相关机制。**方法:**雄性昆明小鼠随机分为模型组,尿激酶($150 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)组,DCK 酶低、中、高剂($150, 300, 450 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)组,*ip* 7 d,每日 1 次,第 7 天给药 30 min 后,各组小鼠 *ip* 0.8% 角叉菜胶,继续每天给药,观察尾部血栓的变化,于 24,36 h 游标卡尺测量鼠尾长度和血栓长度,计算血栓形成率和血栓形成相对长度。Wistar 大鼠随机分为模型组,尿激酶($100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)组,DCK 酶低、中、高剂量($100, 200, 300 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)组,*ip* 10 d,每日 1 次。第 10 天给药 30 min 后,水合氯醛溶液麻醉大鼠,分离右颈总动脉、左颈外静脉,构建右颈总动脉-左颈外静脉旁路循环,比较该旁路循环异物所致血栓湿重。新西兰大白兔随机分为模型组,尿激酶($38 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)组,DCK 酶低、中、高剂量($38, 76, 114 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)组,耳缘静脉注射给药,给药 1 h 后耳缘静脉采血,进行凝血酶原时间(PT),活化部分凝血活酶时间(APTT),凝血酶时间(TT),纤维蛋白原(FIB),优球蛋白溶解时间(ELT),纤维蛋白(原)降解产物(FDP)的检测。**结果:**与模型组比较,DCK 酶组在 24,36 h 各组小鼠鼠尾血栓形成相对长度均明显减少($P < 0.05, P < 0.01$);DCK 酶高、中剂量组的旁路循环血栓湿重明显减少($P < 0.05, P < 0.01$)。DCK 酶高、中剂量组的 PT,APTT,TT 时间明显延长($P < 0.05, P < 0.01$),DCK 酶高、中剂量组 FIB 明显减少($P < 0.05, P < 0.01$),DCK 酶高、中剂量组 ELT 的水平明显降低($P < 0.05$),DCK 酶组 FDP 含量均增加,中剂量组明显增加($P < 0.05$)。**结论:**DCK 酶具有良好的体内溶栓抗栓作用。

[关键词] 豆豉溶栓激酶 DCK; 溶栓; 抗栓; 凝血; 溶血

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0135-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140135

Douchi Fibrinolytic Kinase DCK Thrombolysis and Antithrombotic Function *in vivo*

HE Huan¹, ZHANG Shuo², ZHANG Min¹, YIN Chou¹,
ZHANG Qian¹, GAO Xiu-li^{1*}, ZHANG Rong-ping^{3*}

(1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Guizhou Laboratory Animal Engineering Technology Center, Guizhou Medical
University, Guiyang 550004, China;

3. School of Pharmaceutical Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To study Guizhou Douchi fibrinolytic kinase DCK (DCK enzyme) thrombolysis and antithrombotic function *in vivo*. **Method:** Male Kunming mice were randomly divided into model group, urokinase control group ($150 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$), DCK enzyme low, medium and high dose group ($150, 300, 450 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$), *ip* 7 d, once a day, each group were injected 0.8% carrageenan to build the thrombus model in tail after 30 minutes 7 days administration. Tail thrombosis was observed and the mice tail length and the length of thrombus were measured at 24, 36 h. Thrombus formation rate and thrombosis relative length were calculated. Wistar rats were randomly divided into model group, urokinase control group ($100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) and DCK enzyme low,

[收稿日期] 20160112(014)

[基金项目] 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2013204]4-2号);贵州省普通高等学校工程研究中心建设任务项目(黔教合 KY 字[2015]338)

[第一作者] 贺欢, 硕士, 从事生物新药与体内药物分析研究, Tel:15285136887, E-mail:842546716@qq.com

[通讯作者] *高秀丽, 教授, 硕士生导师, 从事药物制剂质量研究与新药研发工作, Tel:0851-6780461, E-mail:1550434689@qq.com;

*张荣平, 教授, 硕士生导师, 从事天然药物化学研究, Tel:0851-88416289, E-mail:568480489@qq.com

medium and high dose group ($100, 200, 300 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$), *ip* 10 days, once a day. Rats were anesthetized by chloral hydrate solution after 30 minutes the 10 days treatment, the right common carotid artery and left external jugular vein were separated to build the right common carotid artery-left external jugular vein bypass. Thrombus wet weight were get in the bypass circulation. New Zealand white rabbits were randomly divided into model group, urokinase control group ($38 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$), DCK enzyme low, medium and high dose group ($38, 76, 114 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) by ear vein injection administration, blood sampling of ear border vein were administered after 1 h to detect prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), human fibrinogen (FIB), euglobulin clot lysis time (ELT) and fibrin (-ogen) degradation products (FDP). **Result:** Compared with the model group, DCK enzyme group at 24, 36 h tail thrombosis formation relative length were reduced ($P < 0.01, P < 0.05$), DCK enzyme of high, middle dose group of bypass thrombus wet weight were reduced ($P < 0.01, P < 0.05$). The PT, APTT, TT time extended with significant difference ($P < 0.01, P < 0.05$), the FIB of high DCK enzyme group was reduced ($P < 0.05, P < 0.01$), high DCK enzyme and middle dose group of ELT was decreased ($P < 0.05$), and DCK enzyme in each experimental group FDP content were increased, the middle dose group increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** DCK enzyme has a certain thrombolysis and antithrombotic function *in vivo*.

[**Key words**] douchi fibrinolytic kinase DCK; thrombolysis; antithrombotic; coagulation; hemolysis

从中药成分中寻找和开发抗栓和溶栓的药物成为近年来研究的热点。1987 年,日本学者 Sumi 等^[1]首次报道在纳豆中存在一种具有强烈纤溶活性的酶并将之命名为纳豆激酶(NK),研究表明,NK 具有很强的体内外溶栓活性,能口服吸收溶栓,具有开发成为食源性溶栓药物的潜力^[2]。近年来,国内学者分别从日本纳豆与中国豆豉中分离筛选出产纤溶酶菌株,进行了纤溶酶的理化特性、基因克隆与表达、发酵工艺、纯化等方面的研究^[3-5],而对纳豆激酶的体内外溶栓抗栓作用研究甚少,其体内外溶栓抗栓作用机制的相关报道鲜见。课题组从贵州豆豉中分离出一株能产生纤溶活性酶的菌株,该菌株被鉴定为枯草芽孢杆菌,命名为 DCK- β 菌株,并对其产酶基因进行了系统而全面的研究,成功克隆并表达了其产酶基因,优化得到了一套成熟的,产酶率高,稳定性好的液体发酵工艺及酶的纯化技术,由 DCK- β 菌株发酵产生的纤溶活性酶被命名为豆豉溶栓激酶(DCK 酶)^[6-8]。DCK 酶来源于食品,与日常饮食兼容性好,可口服、成本低廉、高酶活性、无体内抗原性。前期的体外溶栓和体外抗凝实验表明 DCK 酶具有体外溶栓和抗凝的作用^[9],本实验在前期研究基础上探讨了 DCK 酶的体内溶栓、抗栓作用,对 DCK 酶的溶栓、抗栓作用进行深入的研究,为阐明其体内溶栓、抗栓机制提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂 TypeI 角叉菜胶(美国 Sigma 公司,批号 C1013-25G),兔优球蛋白溶解时间(ELT)和兔纤维

蛋白(原)降解产物(FDP)测定试剂盒(上海信帆生物科技有限公司,批号分别为 XFSJ1587,380054-W2),肝素钠注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号 1408113)。

1.2 仪器 TGL-16C 型冷冻干燥机(丹麦 Heto-Holten 公司),A04050045 型手提式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司)。

1.3 动物 清洁级雄性昆明小鼠,体重 $20 \sim 22 \text{ g}$;清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重 $200 \sim 220 \text{ g}$;新西兰大耳白兔,雌雄各半,体重 $(2.0 \pm 0.2) \text{ kg}$,以上动物均购自贵阳医学院实验动物中心,合格证号 SCXK(黔)2008-0005。

1.4 DCK 酶样品 DCK 酶冻干粉采用 DCK- β 菌株液体发酵得到 DCK 粗酶,粗酶经盐析,透析,纯化,冷冻干燥得到 DCK 酶冻干粉,测得其酶活力为 $2.118 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。生理盐水溶解 DCK 酶冻干粉配制所需浓度, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤过。

2 方法

2.1 体内血栓模型建立

2.1.1 小鼠尾静脉血栓形成检测 雄性昆明小鼠 50 只,按体重均衡原则,随机分为 5 组,模型(生理盐水)组,尿激酶($150 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)组,DCK 酶低、中、高剂量($150, 300, 450 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)组,*ip* 7 d,注射剂量为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日 1 次。第 7 天给药 30 min 后,各组小鼠 *ip* 0.8% 角叉菜胶,注射剂量为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。继续每天给药,观察尾部血栓的变化,于 24, 36 h 用游标卡尺测量鼠尾长度和血栓长度,计算血栓形成率

和血栓形成相对长度。

$$\text{血栓形成率} = \frac{\text{形成血栓小鼠数}}{\text{小鼠总数}} \times 100\%$$

$$\text{血栓形成相对长度} = \frac{\text{小鼠血栓长度}}{\text{小鼠鼠尾长度}} \times 100\%$$

2.1.2 大鼠右颈总动脉-左颈外静脉旁路血栓湿重检测 Wistar 大鼠 30 只, 体重按均衡原则, 随机分为模型组, 尿激酶(100 U·g⁻¹)组, DCK 酶低、中、高剂量(100, 200, 300 U·g⁻¹)组, ip 10 d, 注射剂量为 20 mL·kg⁻¹, 每日 1 次。第 10 天给药 30 min 后, 水合氯醛溶液麻醉大鼠, 分离右颈总动脉、左颈外静脉, 采用静脉采血针, 两端针头预先用肝素钠抗凝, 静脉采血针的一端插入左颈外静脉, 另一端插入右颈总动脉, 中间的采血管内预先放入一根长 5 cm 的丝线, 血液自右颈总动脉流经采血管, 返回左颈外静脉, 形成右颈总动脉-左颈外静脉旁路循环, 开放血流, 15 min 后中断血流, 称定围绕丝线的血栓湿重。

2.2 家兔凝血和溶血指标检测 新西兰大耳白兔

表 1 DCK 酶对小鼠尾静脉血栓形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/U·g ⁻¹	血栓形成率	24 h 血栓形成相对长度	36 h 血栓形成相对长度	%
模型	-	100	45.78 ± 0.05	48.93 ± 0.20	
尿激酶	150	90	32.50 ± 0.12 ¹⁾	34.58 ± 0.25 ¹⁾	
DCK 酶	450	70	20.41 ± 0.21 ²⁾	21.87 ± 0.27 ²⁾	
	300	80	27.94 ± 0.14 ¹⁾	32.46 ± 0.19 ¹⁾	
	150	90	39.35 ± 0.30	41.28 ± 0.13	

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01(表 2~4 同)。

3.2 DCK 酶对大鼠右颈总动脉-左颈外静脉旁路血栓湿重的影响 DCK 酶组、尿激酶组与模型组比较血栓湿重均较轻, DCK 酶对该旁路循环异物所致血栓湿重的减少具有剂量依赖性, 与模型组比较, 高剂量组血栓湿重显著减少(P < 0.01), 尿激酶组, 中剂量组血栓湿重明显减少(P < 0.05)。见表 2。

表 2 DCK 酶对大鼠右颈总动脉-左颈外静脉旁路血栓湿重的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 DCK enzyme rat right carotid artery-the left jugular vein bypass thrombosis wet weight($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/U·g ⁻¹	血栓湿重/mg
模型	-	66.4 ± 7.0
尿激酶	100	38.7 ± 4.5 ¹⁾
DCK 酶	300	29.2 ± 3.4 ²⁾
	200	38.9 ± 6.7 ¹⁾
	100	45.6 ± 4.9

3.3 DCK 酶对家兔凝血指标的影响 与模型组比较, 尿激酶组 PT 时间明显延长(P < 0.05), DCK 酶

30 只, 体重(2.0 ± 0.2) kg, 雌雄各半, 体重和性别按均衡原则, 随机分为模型组, 尿激酶(38 U·g⁻¹)组, DCK 酶低、中、高剂量(38, 76, 114 U·g⁻¹)组, 耳缘静脉注射给药 1 mL·kg⁻¹。给药 1 h 后采用 3.2% 枸橼酸钠血凝实验管耳缘静脉采血 1.8 mL, 送至贵阳医学院检验科进行凝血酶原时间(PT), 活化部分凝血活酶时间(APTT), 凝血酶时间(TT), 纤维蛋白原(FIB)的检测。ELT 和 FDP 含量利用试剂盒测定。

2.3 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件, 计量结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为有统计学差异。

3 结果

3.1 DCK 酶对小鼠尾静脉血栓形成的影响 DCK 酶组及尿激酶组在 24, 36 h 小鼠鼠尾血栓形成相对长度均较模型组减少, 具有剂量效应。与模型组比较, DCK 酶高、中剂量组在 24, 36 h 血栓形成相对长度减少(P < 0.05, P < 0.01)。见表 1。

高剂量组 PT 时间显著延长(P < 0.01), 高剂量组与尿激酶组 APTT 时间明显延长(P < 0.05), DCK 酶高、中剂量组与尿激酶组 TT 时间明显延长(P < 0.05)。与模型组比较, DCK 酶中剂量组与尿激酶组 FIB 明显减少(P < 0.05), 高剂量组 FIB 显著减少(P < 0.01)。见表 3。

3.4 DCK 酶对家兔溶血指标的影响 与模型组比较, DCK 酶组及尿激酶组的 ELT 水平均降低, FDP 含量均增加, 尿激酶组, DCK 酶高、中剂量组的 ELT 水平明显减低(P < 0.05), 中剂量组 FDP 明显增加(P < 0.05)。见表 4。

4 讨论

4.1 体内血栓模型 角叉菜胶是一种较强的致炎物质, 注射角叉菜胶后小鼠内皮细胞受损, 局部发生炎症, 注射角叉菜胶制造小鼠尾部血栓模型, 小鼠尾尖逐渐变紫变黑, 并向根部不断扩散; 右颈总动脉-左颈外静脉旁路循环人为开放血流, 当血液流经采

表 3 DCK 酶对家兔凝血指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Influence of DCK enzyme on rabbit coagulation indices($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $U \cdot g^{-1}$	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/ $g \cdot L^{-1}$
模型	-	9.9 ± 0.4	19.8 ± 0.4	20.8 ± 1.5	3.7 ± 0.2
尿激酶	38	11.3 ± 0.3 ¹⁾	23.0 ± 1.0 ¹⁾	23.5 ± 1.6 ¹⁾	2.6 ± 1.0 ¹⁾
DCK 酶	38	10.5 ± 0.7	20.7 ± 1.5	21.8 ± 2.6	3.4 ± 1.4
	76	10.4 ± 0.9	21.1 ± 1.9	23.7 ± 1.3 ¹⁾	2.4 ± 0.4 ¹⁾
	114	11.7 ± 1.0 ²⁾	23.6 ± 2.0 ¹⁾	23.6 ± 2.6 ¹⁾	1.4 ± 0.9 ²⁾

表 4 DCK 酶对家兔溶血指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Influence of DCK enzyme on rabbit hemolysis indices($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $U \cdot g^{-1}$	ELT/ $ng \cdot L^{-1}$	FDP/ $\mu g \cdot L^{-1}$
模型	-	180.7 ± 13.5	411.4 ± 40.5
尿激酶	38	105.8 ± 9.3 ¹⁾	452.2 ± 38.1
DCK 酶	38	165.4 ± 12.4	446.7 ± 32.6
	76	96.6 ± 13.8 ¹⁾	501.4 ± 27.8 ¹⁾
	114	91.4 ± 10.1 ¹⁾	476.7 ± 23.6

血管时血小板接触到异物丝线后,围绕丝线的表面聚集形成血小板血栓,研究 DCK 酶能有效减轻角叉菜胶所致小鼠尾静脉血栓以及丝线所致大鼠旁路循环血栓,表明 DCK 酶能够保护内皮细胞受损及防止血小板聚集造成血栓,具有一定的体内抗栓作用。

4.2 对家兔凝血和溶血指标的影响 PT 和 APTT 分别是目前最常用的检查外源性凝血系统和内源性凝血系统的筛选指标。DCK 酶能延长家兔血浆的 PT 和 APTT,提示 DCK 酶可以通过干扰外源性凝血因子和内源性凝血因子的活性来抑制纤维蛋白的形成。DCK 酶能延长家兔血浆的 TT,表明 DCK 酶能增强家兔血浆的纤溶活性。FIB 的含量测定是凝血系统筛选的经典指标之一,不同剂量的 DCK 酶均能使血浆的纤维蛋白原含量减少,表明 DCK 酶可以通过激活纤溶酶原或直接水解纤维蛋白原,使血浆的纤溶活性增强。ELT 是研究溶栓药物纤溶活性的常用指标。DCK 酶使家兔血浆的 ELT 明显缩短,表明 DCK 酶能提高家兔血浆的纤溶活性。FDP 是纤维蛋白(原)降解产物,其含量测定是判断纤溶系统活性的经典筛选实验。给予 DCK 酶后家兔血浆的 FDP 含量上升,表明 DCK 酶能增强血浆的纤溶活性。

体内血栓模型,家兔凝血和溶血指标的研究表明 DCK 酶能延长 PT,TT,APTT,降低 ELT,FIB 含量,增加 FDP 的量,在体内不仅能够保护内皮细胞受损以及防止血小板聚集造成血栓,还可以通过干扰外源性凝血因子和内源性凝血因子的活性,激活

纤溶酶原或直接水解纤维蛋白原等途径增强血浆的纤溶活性,具有一定的体内溶栓抗栓作用,这将为 DCK 酶进一步开发成为国家级生物新药奠定基础,为其临床应用提供必要的理论依据。

[参考文献]

[1] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese Natto;a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. *Experientia*,1987,43(10):1110-1111.

[2] Sumi H,Hamada H,Nakanishi K,et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase [J]. *Acta Haematol*, 1990, 84 (3) : 139-143.

[3] 李江伟,陈新梅,冉国侠. 豆豉溶栓酶的分离纯化及部分药效学研究 [J]. *中国药理学杂志*, 1999, 34 (5) : 59.

[4] Sumi H,Yanagisawa Y,Yatagai C,et al. Natto bacillus as an oral fibrinolytic agent:Nattokinase activity and the ingestion effect of *Bacillus subtilis natto* [J]. *FSTR*, 2004,10(1):17-20.

[5] Fujita M,Hong K,Ito Y,et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat[J]. *Biol Pharm Bull*,1995,18(10):1387-1391.

[6] 张敏,宋智魁,王鹏娇,等. 贵州豆豉纤溶酶发酵液中活性酶的盐析分离纯化[J]. *贵阳医学院学报*,2013,38(3):235-238.

[7] 王鹏娇,孟小夏,张敏,等. 大孔树脂纯化豆豉溶栓酶的工艺优选 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20 (11) : 30-33.

[8] 高秀丽,宋智魁,王清忱,等. 贵州豆豉激酶组分的 Tricine-SDS-PAGE 电泳方法研究 [J]. *贵阳医学院学报*, 2010, 35 (6) : 575-577.

[9] 高秀丽,鲍鹏,张敏,等. 一种贵州豆豉酶提取物的溶栓活性及溶栓机理研究 [J]. *贵阳医学院学报*, 2007, 32 (4) : 362-364.

[责任编辑 张丰丰]