

Nattozimes™ 对大鼠尾部血栓形成的影响

殷文哲, 曹烨骏, 丛峰松*

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要: 目的: 探讨 Nattozimes™ 对角叉菜胶所致大鼠尾部血栓形成的影响。方法: 将大鼠随机分为模型对照组、阿司匹林组、低剂量组(10mg/(kg·d))、中剂量组(20mg/(kg·d))、高剂量组(60mg/(kg·d)), 灌胃 30d。倒数第 3 次灌胃后所有组均利用角叉菜胶构建尾部血栓模型, 观察不同时间后的黑尾长度, 并抽静脉血检测凝血功能、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)及其抑制剂(PAI)。结果: 低、中剂量组与模型对照组相比, 分别在 48h 和 24h 内黑尾长度明显减小; 60h 后, 各组之间均无显著差异。与模型对照组相比, 低、中剂量组凝血酶原时间(PT)及其国际标准化比值(INR)变大; 低、中、高剂量组活化部分凝血活酶时间(APTT)显著缩短; 高剂量组凝血酶时间(TT)显著缩短, 血浆纤维蛋白原(Fb)值显著升高; 低、高剂量组 PAI 减小; 各组 t-PA 均增加。结论: 口服 Nattozimes™ 对于角叉菜胶所致的大鼠尾部血栓具有一定的溶栓抗栓作用。

关键词: Nattozimes™; 角叉菜胶; 血栓形成; 凝血功能; 组织型纤溶酶原激活剂; 纤溶酶原激活酶抑制因子

Effect of Nattozimes™ on Tail Thrombosis of Rats

YIN Wen-zhe, CAO Ye-jun, CONG Feng-song*

(School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Objective: To explore the effect of Nattozimes™ on carrageenan-induced tail thrombosis in rats. Methods: Male rats were randomly divided into five groups including model control group, aspirin group, low-dose Nattozimes™ group, middle-dose Nattozimes™ group and high-dose Nattozimes™ group. On the 28th days of the intragastric administration period of 30 days, tail thrombosis model was established by subcutaneous injection carrageenan into the hind foot pad. The length of dark tails at different time points was observed. Meanwhile, PT, APTT, TT, Fb, INR, t-PA and PAI in vein blood were determined. Results: At 24 and 48 hours after tail thrombosis model creation, black tails in the low- and middle-dose Nattozimes™ groups were longer than those in the model control group, but no obvious difference in each group was observed at 60 hours. Compared with the model control group, PT and INR in the low- and middle-dose Nattozimes™ groups were prolonged, APTT was considerably shortened and t-PA was higher in each dose group, and the high-dose Nattozimes™ group exhibited a distinctly shorter TT and a notably increased Fb, and the low- and high-dose groups showed a decrease in PAI. Conclusion: Eating Nattozimes™ can prevent the formation of carrageenan-induced tail thrombosis in rats.

Key words: Nattozimes™; carrageenan; thrombosis; coagulation; tissue-type plasminogen activator (t-PA); plasminogen activator inhibitor (PAI)

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0306-04

血管栓塞由血纤维蛋白在血管内凝集所致, 是引起多种心脑血管疾病的主要因素, 溶解血栓是治疗这类疾病的重要手段。但现在使用的溶栓药都具有一些缺陷, 尿激酶(urokinase, UK)和链激酶(streptokinase, SK)纤溶特异性低, 并伴有内出血倾向; 组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, t-PA)、重组单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(recombinant single urokinase, rSUC-PA)和葡激酶(staphylokinase, SaK)等新一代溶

栓药物由于存在体内半衰期短和生产成本高等缺点, 限制了它们在临床上的应用^[1]。

纳豆是日本盛行千年的传统食物。1987 年, 须见洋行首先发现了纳豆激酶并在文章中介绍了其纤溶活性^[2]。纳豆激酶(nattokinase, NK)是一种在纳豆发酵过程中由纳豆菌(*Bacillus natto*)或纳豆枯草杆菌(*B. Subtilis natto*)产生的丝氨酸蛋白酶。纳豆激酶具有很强的纤溶活性, 不但能直接作用于纤溶蛋白, 而且还能激活体内纤溶酶

收稿日期: 2010-10-19

作者简介: 殷文哲(1989—), 男, 本科生, 研究方向为生物技术。E-mail: fenghuangshe005@yahoo.com.cn

* 通信作者: 丛峰松(1970—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物大分子的结构及功能。E-mail: fscong@sjtu.edu.cn

原, 从而增加纤溶酶的量与作用。纳豆激酶具有安全性好、作用迅速、经口服后可迅速入血、纤溶活性强、可由细菌发酵生产、作用时间长等优点^[3]。

美国 NEC 公司也意识到在美国的饮食补充市场上需要开发出一种类似纳豆激酶的产品, 因此研发出了具有与纳豆激酶有相同功效的蛋白水解酶 Nattozimes™。Nattozimes™ 为利用 *Aspergillus oryzae* 发酵产生的蛋白水解酶, 可以取代纳豆激酶作为对抗血栓的保健食品。

本研究为探讨 Nattozimes™ 对于体内血栓形成的影响, 以大鼠为实验对象, 应用角叉菜胶构建尾部血栓, 研究 Nattozimes™ 对于血栓形成的影响和机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量(200 ± 20)g, 6 周龄, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供(动物许可证号: SCXK(沪)2003-0002)。上海交通大学闵行校区药学院动物饲养间, 室温(24 ± 2)℃, 湿度(70 ± 5)%, 分每笼 5 只饲养, 饲料由上海仕林生物科技有限公司提供。

1.2 材料与试剂

角叉菜胶(C1013-25G Type I) 美国 Sigma 公司。

Nattozimes™(≥ 35000FU/g) 威达国际股份有限公司; 肠溶阿司匹林片(25mg/片) 上海信谊药厂有限公司; ELISA 检测试剂盒 上海蓝基生物科技有限公司。

1.3 仪器与设备

一次性使用无菌注射器 常州岳康医疗器材有限公司; 一次性使用真空采血管 江苏康健医疗用品有限公司; 全自动血凝分析仪(SYSMEX CA-1500) 日本 Sysmex 公司; SSW 型电热恒温水槽 上海博讯实业有限公司; DDL-5 型冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.4 方法

1.4.1 分组与灌胃

将 50 只大鼠随机分为 5 组: 模型对照组、阿司匹林组、Nattozimes™ 低、中、高剂量组, 各 10 只。各组均采用灌胃途径给药。灌胃 30d, 灌胃容积 0.01mL/(g · d)。模型对照组予生理盐水灌胃; 阿司匹林组将肠溶阿司匹林

以蒸馏水配成 2mg/mL 溶液, 混匀, 灌胃量 20mg/(kg · d), 相当于 60kg 成人 100mg/d 剂量(1.7mg/kg)的 12 倍^[4]; Nattozimes™ 低、中、高剂量组分别将 Nattozimes™ 以蒸馏水配成 1、2、6mg/mL 溶液, 混匀, 灌胃量分别为 10、20、60mg/(kg · d)。

1.4.2 造模

于倒数第 3 次灌胃后开始造模, 精密称取角叉菜胶, 以生理盐水配成 3.5g/100mL 质量浓度^[5]; 给大鼠称质量, 各组均于后足趾部皮下注射角叉菜胶, 剂量为 30mg/kg。造模后将大鼠置于(18 ± 2)℃室内饲养, 测量大鼠造模 24、48、60h 后黑尾长度。在最后一次测量黑尾长度后, 各组大鼠以水合氯醛(10%), 40mL/kg 麻醉, 下腔静脉取全血, 分装于两个试管, 以枸橼酸钠抗凝, 取全血 4mL 即查血浆凝血酶原时间(PT)、血浆活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、血浆纤维蛋白原(Fb)(以上数据由上海市第五人民医院检验科检测)。根据国际标准化比值(INR)计算公式进行计算。

$$INR = \left(\frac{PT_{\text{test}}}{PT_{\text{normal}}} \right)^{ISI}$$

式中: PT_{test} 为所测血浆 PT 值; PT_{normal} 为正常大鼠 PT 值; ISI 为国际敏感度指数。

另取全血 2mL 分离血浆, 检测 t-PA、PAI-1, 采用 ELISA 法, 使用试剂盒测定。

1.5 统计学处理

实验结果用方差分析及 q 检验做统计学分析。

2 结果与分析

2.1 Nattozimes™ 对大鼠黑尾长度的影响

由表 1 可知, 造模 24h 后, 低剂量组和中剂量组与模型对照组有显著差异, 黑尾长度明显较小($P < 0.05$)。黑尾率较模型对照组也明显较小; 48h 后, 低剂量组黑尾长度仍与模型对照组有显著差异($P < 0.05$)。

以上结果表明: 低、中剂量的 Nattozimes™ 能够有效减轻大鼠尾部血栓的形成, 在 60h 时已与模型对照组没有明显差异; 未发现高剂量的 Nattozimes™ 和口服阿司匹林对角叉菜胶所致的大鼠尾部血栓的形成有减轻的作用。

表 1 实验大鼠造模 24、48、60h 黑尾长度($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The length of black tail at 24, 48 h and 60 h after tail thrombosis model establishment ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	24h 黑尾长度/cm	24h 黑尾率/%	48h 黑尾长度/cm	48h 黑尾率/%	60h 黑尾长度/cm	60h 黑尾率/%
模型对照组	10	12.89 ± 3.15	90	13.32 ± 3.18	90	12.47 ± 4.61	100
阿司匹林组	9	12.34 ± 6.61	88.9	13.90 ± 6.44	88.9	13.94 ± 6.47	88.9
低剂量组	10	7.00 ± 5.45 [△]	70	8.06 ± 5.26 [△]	90	8.14 ± 5.29	90
中剂量组	10	7.28 ± 5.93 [△]	70	10.13 ± 4.79	100	10.15 ± 4.78	100
高剂量组	10	14.57 ± 4.50	100	15.14 ± 4.33	100	15.19 ± 4.44	100

注: △. 与模型对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)。下同。

表2 实验大鼠PT、APTT、TT检测结果($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of Nattozimes™ on PT, APTT and TT in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	PT/s	动物数	APTT/s	动物数	TT/s
模型对照组	9	8.30 ± 0.13	9	20.30 ± 0.97	9	50.49 ± 2.34
阿司匹林组	9	8.57 ± 0.14	9	20.70 ± 2.60	9	50.89 ± 1.93
低剂量组	10	8.64 ± 0.26 [△]	10	16.86 ± 1.21 ^{△△}	10	51.36 ± 1.03
中剂量组	10	8.65 ± 0.28 [△]	8	18.08 ± 1.44 ^{△△}	10	49.06 ± 1.28
高剂量组	10	8.40 ± 0.46	7	16.97 ± 0.77 ^{△△}	10	47.82 ± 2.57 ^{△△}

注: △△.与模型对照组比较有极显著性差异($P < 0.01$)。下同。

2.2 Nattozimes™ 对实验大鼠凝血功能的影响

表3 实验大鼠Fb、INR检测结果($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of Nattozimes™ on Fb and INR in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	Fb/(g/L)	动物数	INR
模型对照组	9	3.60 ± 0.47	9	0.73 ± 0.01
阿司匹林组	9	3.63 ± 0.48	9	0.75 ± 0.01
低剂量组	10	3.89 ± 0.32	10	0.76 ± 0.02 [△]
中剂量组	10	3.88 ± 0.40	10	0.76 ± 0.02 [△]
高剂量组	10	4.60 ± 1.05 ^{△△}	10	0.74 ± 0.04

由表2、3可知,低剂量和中剂量的Nattozimes™可以使PT延长,PT比值即INR变大($P < 0.05$);低、中、高剂量的Nattozimes™均能使APTT极显著性缩短($P < 0.01$);高剂量的Nattozimes™可使TT极显著性缩短,并使Fb值极显著性升高($P < 0.01$)。参考魏陵博等^[4,6-7]在多个实验中的大鼠正常组数据,低剂量组及中剂量组的PT、TT和Fb值趋于正常值。

2.3 Nattozimes™ 对实验大鼠纤溶功能的影响

表4 实验大鼠纤溶功能指标t-PA、PAI检测结果($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Effect of Nattozimes™ on t-PA and PAI in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	t-PA/(μg/L)	动物数	PAI/(μg/L)
模型对照组	9	16.387 ± 1.445	4	6.848 ± 1.127
阿司匹林组	8	29.302 ± 6.364	9	3.768 ± 0.796
低剂量组	9	27.138 ± 5.212 ^{△△}	10	4.127 ± 0.878 ^{△△}
中剂量组	8	25.219 ± 3.996 ^{△△}	9	6.260 ± 0.939
高剂量组	8	24.827 ± 8.673 ^{△△}	10	4.761 ± 1.345 ^{△△}

由表4可知,低、中、高剂量组的Nattozimes™均能使t-PA值增加($P < 0.01$)。低剂量和高剂量的Nattozimes™能使PAI值降低($P < 0.01$)。数据表明,Nattozimes™通过激活t-PA活性及降低PAI的活性,从而影响大鼠纤溶系统。

3 讨 论

角叉菜胶是从某些红藻类海草中提炼出来的亲水性胶体,可用于制备多种组织炎症模型。胡三觉等^[8]发现可以用它造成大鼠尾部血栓形成模型,这种静脉血栓形成是由局部炎症与内皮细胞的损坏所引起的混合型血栓。

实验中没有发现阿司匹林对于角叉菜胶引起的大鼠尾部血栓形成有抑制作用,这与魏陵博等^[4]在对于角叉菜胶引起血栓机制的研究中的发现一致,口服阿司匹林不能减缓此种类型的血栓形成。

纳豆激酶作为一种丝氨酸蛋白酶,具有水解纤维蛋白作用,能有效溶解纤维蛋白^[9]。研究中的确发现口服Nattozimes™能够明显减缓大鼠尾部血栓的形成。

PT及其国际标准化比值INR是凝血系统的一个较为敏感的筛选实验。PT和INR主要反映外源性凝血是否正常。PT值和INR值增大提示Nattozimes™能够影响外源性凝血途径中的凝血因子,从而抑制凝血酶原向凝血酶转变,以此来减少纤维蛋白原向纤维蛋白的转变。

APTT是反映内源性凝血途径的重要指标。研究中发现各组APTT值均减小,提示Nattozimes™可能会造成内源性凝血途径加剧。但大鼠口服Nattozimes™后尾部血栓确有减缓,说明Nattozimes™主要是通过影响外源性凝血途径来实现溶栓,并且可以借此弥补缓解其本身造成的内源性凝血途径加剧。

TT和Fb是反映共同途径活性的指标^[10]。实验中发现口服Nattozimes™后高剂量组TT减小,Fb增大,在其他对纳豆激酶的研究中并没有显示这一特性^[11]。推测这些都可能与高剂量的Nattozimes™对内源性凝血途径的作用有关,具体还需通过进一步的实验进行考证。

血栓形成也影响纤溶系统。t-PA是启动纤溶系统的重要因子,它可激活体内的纤溶酶原,形成纤溶酶,纤溶酶可将已形成纤维蛋白栓子溶解,对维持血管内血流的通畅起很重要的作用。PAI能够特异性地抑制t-PA,因此它们的合成和释放在血栓性疾病的发病机理中起关键作用,血栓形成或是血管堵塞后PAI均会增高^[12]。实验中口服Nattozimes™与t-PA和PAI的关系表明Nattozimes™对减轻大鼠血栓形成的作用机理与激活t-PA及抑制PAI有关。不少外国的学者在之前就发现了这一点^[13-16]。

总之,口服Nattozimes™对于角叉菜胶所致的大鼠尾部血栓具有一定的溶栓作用,其主要的机理为:1)作为蛋白酶,水解纤维蛋白;2)影响外源性凝血系统因

子, 减缓血栓形成; 3) 激活 t-PA 及抑制 PAI, 进而达到溶解血栓的目的。因此, NattozimesTM 是一种很好的溶栓抗栓药物, 有望成为新一代的口服抗血栓药物。

参考文献:

- [1] 杨明俊, 杨庆尧, 杨晓彤. 纳豆激酶的研究进展[C]// 第六届全国药用植物和植物药学术研讨会论文集. 长春: 中国植物协会, 2006: 207-209.
- [2] 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.
- [3] 缪仕伟, 孙智杰. 纳豆激酶的研究进展[J]. *生物学通报*, 2008, 43(7): 5-7.
- [4] 魏陵博, 戎冬梅, 吉中强, 等. 角叉菜胶致大鼠尾部血栓形成的机制[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2008, 6(5): 542-543.
- [5] 袁本香, 杨桂珍, 任艳艳. 沙棘总黄酮抗角叉菜胶诱发大鼠血栓形成作用的研究[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(8): 1879-1880.
- [6] 丁书文, 魏陵博, 史红霞, 等. 白酒对交叉菜胶所致大鼠尾部血栓形成的影响[J]. *中国预防医学杂志*, 2004, 5(3): 161-163.
- [7] 王鹏, 魏陵博, 彭敏, 等. 解毒通络法对血栓形成大鼠 AT-III 活性以及 D-二聚体含量的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2006, 4(10): 876-878.
- [8] 胡三觉, 田巧莲, 顾建文, 等. 一种新的体内血栓形成动物模型[J]. *中华血液学杂志*, 1993, 14(10): 541-542.
- [9] SUMI H, YOSHIKAWA M, BABA T, et al. Elastase activity in natto, and its relation to nattokinase[J]. *Nippon Nogei Kagakukaishi*, 1999, 73(11): 1187-1190.
- [10] 王黎卫, 明自强, 俞林明, 等. 大黄对急性有机磷农药中毒患者凝血功能的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2007, 16(9): 1199-1200.
- [11] 邵玉英, 聂凤环, 马静洁. 纳豆激酶在大鼠机体内外对凝血功能的影响[J]. *延边大学医学学报*, 2010, 33(1): 10-12.
- [12] 刘国勋, 吴铁, 陈志东, 等. 抗栓中药对小白鼠体内血栓形成及血浆 t-PA 及 PAI 的影响[J]. *白求恩医科大学学报*, 1999, 25: 496-497.
- [13] CHOI K S, FITZPATRICK S L, FILIPENKO N R, et al. Regulation of plasmin-dependent fibrin clot lysis by annexin II heterotetramer[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(2): 25212-25221.
- [14] FUJITA M, ITO Y, HONG K, et al. Characterization of nattokinase-degraded products from human fibrinogen or cross-linked fibrin[J]. *Fibrinolysis*, 1995(9): 157-169.
- [15] CHAVAKIS T, ROBIN A, PIXLEY I, et al. A novel antithrombotic role for high molecular weight kininogen as inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 function[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(36): 32677-32682.
- [16] URONO T, HAYATO I, KAZUO U, et al. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* Cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(27): 24690-24696.