

文章编号:1001-6880(2016)11-1789-05

光裸方格星虫纤溶酶 SNFE 体外溶栓作用及安全性初评

李映新¹, 李肖肖², 黄媛恒³, 黎钦蓉⁴, 雷丹青^{5*}¹广西医科大学药学院, 南宁 530021; ²桂东人民医院, 梧州 543001;³广西医科大学基础医学院; ⁴广西医科大学全科医学院; ⁵广西蛇毒研究所, 南宁 530021

摘要:研究光裸方格星虫纤溶酶 SNFE 体外溶栓作用并初步评价药物的生物安全性。通过标准纤维蛋白平板和加热纤维蛋白平板实验、剩余可凝纤维蛋白原法、体外溶栓实验研究 SNFE 体外溶栓作用及作用方式;通过皮下出血实验及体外溶血实验初步评估 SNFE 的生物安全性。结果发现,SNFE 在体外不仅具有激酶活性,且能直接溶解纤维蛋白原和纤维蛋白,对血凝块具有良好的溶栓作用,同时无出血活性及溶血作用,具有一定的开发价值。

关键词:溶栓作用;纤溶酶;光裸方格星虫

中图分类号:R963

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.018

The *in vitro* Anti-thrombolytic Effect and Bio-security of Fibrinolytic Enzyme SNFE from *Sipunculus nudus* Linnaeus in Guangxi Coastal Area of China

LI Ying-xin¹, LI Xiao-xiao², HUANG Yuan-heng³, LI Qin-rong⁴, LEI Dan-qing^{5*}¹Pharmaceutical school, Guangxi medical University, Nanning 530021, China; ² Guidong people's hospital,³ Wuzhou 543001, China; ⁴ School of preclinical medicine, Guangxi Medical University; ⁴ General medical school of Guangxi Medical University; ⁵ The Institute of Snake Venom Research of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the *in vitro* anti-thrombolytic effect and to preliminary evaluate on the bio-security of the fibrinolytic enzyme SNFE from *Sipunculus nudus* Linnaeus in Guangxi Coastal Area of China. The *in vitro* anti-thrombolytic effect and action mode of SNFE were elucidated using the plasminogen free and rich wells fibrin plate assay, detecting the residual of thrombin clottable fibrinogen contents, and thrombolytic experiment. The bio-security was assessed by subcutaneous hemorrhage and hemolysis experiments. Results showed that SNFE not only had the kinase activity, but also directly dissolved fibrin and fibrinogen, it can induce clot lysis *in vitro*, and had no obvious hemolysis and hemorrhagic effects.

Key words: anti-thrombolytic effect; fibrinolytic enzyme; *Sipunculus nudus* Linnaeus

血栓栓塞性疾病是致死率极高的疾病,严重危害人类健康,目前对抗栓溶栓药物的研究仍是热点。其中,天然海洋药物由于其特殊的生存环境,与陆地天然药物比较具有生物活性高等独特优势,近年来海洋医药产业呈现高速增长趋势。光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*),俗称沙虫、沙肠子,在我国沿海均有分布,其肉质鲜美,为传统食补材料,富含蛋白质、氨基酸、多糖等多种活性物质,具有增强免疫力、抗疲劳、延缓衰老、滋阴降火以及清肺化痰等功效^[1-3],被称为“海洋冬虫夏草”^[4],但其内脏无利用

价值,往往丢弃之。广西北部湾盛产光裸方格星虫,本课题组收集方格星虫内脏一批,从其匀浆液中提取一分子量为 32 KD 的蛋白 SNFE(国家发明专利[NO. 201010210919. 5]),并测定了理化性质^[5]。初步发现 SNFE 具有纤溶活性,提示其在溶栓药物的开发中有一定的研究价值,本文通过研究 SNFE 的体外溶栓作用和生物安全性,为深度开发和应用 SNFE 提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明小鼠,体重 18 ~ 22 g,雄雌各半;新西兰大白兔,体重 2.0 ~ 2.5 kg,动物生产许可证号:SCXK 桂 2014-0002,均购于广西医科大学实验动物中心。

收稿日期:2016-05-06 接受日期:2016-09-21

基金项目:广西壮族自治区教育厅专利资助项目(ZL2014008);广西医科大学青年基金(GXMUYSF2014025);广西高校-广西再生医学重点实验室开放课题(15-05)

* 通讯作者 Tel:86-771-5358272; E-mail:506448694@qq.com

1.2 试剂

光裸方格星虫购于本地海鲜市场;五步蛇毒纤溶酶冻干粉由广西医科大学蛇毒研究所提供;冻干人纤维蛋白原(上海莱士血制品有限公司);凝血酶(河南中泰药业有限公司);尿激酶(广东丽珠集团生物化学制药有限公司);DEAE Sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech), Sephadex G-75 (Pharmacia Biotech),其余试剂为国产分析纯。

1.3 仪器

ME204E 电子分析天平(德国梅特勒),UV2100 紫外-可见分光光度计(日本岛津)。

1.4 SNFE 的分离纯化^[5]

新鲜方格星虫,取其内脏以3倍体积PBS缓冲液(0.02M,pH 7.5)在4℃条件下匀浆抽提,得粗酶液。粗酶液加入固体硫酸铵使饱和度达到50%以沉淀活性蛋白。将收集的活性蛋白2g溶于15mL PBS缓冲液(0.02M,pH 7.5)中,3000 rpm/min离心10 min,取上清液上样于用同一缓冲液平衡的DEAE Sepharose CL-6B柱(2.6 cm×50 cm),用0~0.8 M NaCl进行梯度洗脱,流速为0.5 mL/min,收集第4峰。收集组分经透析浓缩后,上样于PBS缓冲液(0.02M,pH 7.5)平衡的Sephadex G-75(2.6 cm×100 cm)柱,用PBS缓冲液(0.02 M,pH 7.5)洗脱,流速为0.5 mL/min,收集第3峰,将所收集组分透析并冻干,干粉存于-20℃冰箱备用。使用时,用生理盐水溶解至所需浓度。

1.5 SNFE 的溶栓作用方式测定

参照经典琼脂糖纤维蛋白平板法^[6],以尿激酶为对照,研究SNFE的溶栓作用方式。取2%琼脂糖溶液(用含0.15M NaCl,0.02M pH 7.5 PBS缓冲液配制)4 mL,铺板前加入1 mL含10单位凝血酶溶液,在55℃水浴中与0.4%人纤维蛋白原溶液(用含0.15M NaCl,0.02M pH 7.5 PBS缓冲液配制)5 mL混合并倒入无菌培养皿(直径90 mm)中,水平放置30 min,凝固后即为标准纤维蛋白平板。另取一标准纤维蛋白平板在恒温干燥箱中85℃加热30 min,室温放置30 min,即成为加热平板。在标准平板和加热平板上分别用打孔器打直径为3 mm的小孔,各平板小孔依次加入尿激酶(250 IU/mL)10 μL,SNFE溶液(250 μg/mL)10 μL,然后将平板置于37℃保温18 h后,取出观察透明溶圈情况。

1.6 水解纤维蛋白原活性测定

参照文献方法^[7]并加以改进。将200 μL的

SNFE溶液(0.5 mg/mL)在试管中和1% (w/v)的纤维蛋白原溶液0.5 mL混合,混匀后立即测定280 nm的吸光度(A_0),随后将混合物在37℃水浴箱中孵育,各组混合物分别于孵育5、15、30、60 min后加入凝血酶(10 IU/mL)100 μL,继续孵育10 min后2500 rpm离心5 min,取上清液测280 nm的吸光度(A_s),计算不同时间间隔残余的凝血酶可凝性纤维蛋白原含量。空白对照组以等体积生理盐水代替SNFE孵育60 min。

$$\text{凝血酶可凝性纤维蛋白原含量} (\%) = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\%$$

1.7 体外溶栓实验^[8]

从家兔心脏取血于无菌培养皿,4℃放置,待其完全凝固后用生理盐水漂洗除去表面粘附的血细胞和杂质,切成小块并分别称重(W)。将血凝块随机放入无菌试管,分为5组,每组3支平行管。分别加入10 mL低、中、高剂量SNFE溶液(0.25、0.5、1.0 mg/mL),空白对照组加入等体积生理盐水、阳性对照组加入的等体积尿激酶溶液(10,000 IU/mL);放置37℃恒温孵育,6 h后用无菌镊子从各组试管中取出血凝块,在生理盐水中漂洗后滤纸吸干,称重(G),计算6 h后血凝块溶解率。

$$\text{血凝块溶解率} (\%) = (W - G) / W \times 100\%$$

1.8 出血活性测定^[9]

18只昆明小鼠,随机分成3组,每组6只,乙醚麻醉后,分别皮下注射生理盐水,1 mg/mL的五步蛇毒纤溶酶,1 mg/mL的SNFE,各组给药体积均为0.2 mL,每2 h观察小鼠生命状态,24 h后处死小鼠,剪下背部皮肤,检查皮下出血情况。

1.9 体外溶血实验^[10]

家兔心脏取血,置于有玻璃珠的三角瓶中,迅速振摇除去纤维蛋白,使成为脱纤血,将血移至无菌离心管,加入生理盐水10 mL,混匀后2500 rpm离心5 min,除去上清,再加入适量生理盐水混匀后离心,如此反复3~4次,直至上清液呈现无色透明。取沉淀即为红细胞,按照所得红细胞体积,加入适量生理盐水稀释成2% (V/V)的混悬液,按表1分别在试管中加入溶液,每管设三个平行对照,第6管为阴性对照。各试管轻轻摇匀,在37℃恒温水浴中保温3 h后,2500 rpm离心5 min,取上清,测定各管在540 nm波长下的吸光值。

1.10 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用SPSS 13.0软件t检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 SNFE 的溶血活性测定

Table 1 Evaluating the thrombolytic effect of SNFE

管号 Tube Numbers	1	2	3	4	5	6
250 μg/mL SNFE (mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	--
生理盐水 Normal saline (mL)	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	2.5
蒸馏水 distilled water (mL)	--	--	--	--	--	--
2% 红细胞悬液 2% red blood cell suspension (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

2 结果与讨论

2.1 SNFE 的溶栓作用方式测定

在标准纤维蛋白平板上,SNFE 和尿激酶均产生透明溶圈;而在加热平板上,尿激酶不产生透明溶圈,SNFE 产生透明溶圈(图 1)。由于市售的纤维蛋

白原试剂中含有少量纤溶酶原被激活成纤溶酶后,会在标准纤维蛋白平板上形成透明溶圈,而加热平板中纤溶酶原被灭活,纤溶酶原激活物无法激活纤溶酶原产生溶酶圈^[11]。此实验结果说明,SNFE 除了具有纤溶酶原激活作用外,还具有不依赖于纤溶酶原而直接溶解纤维蛋白的作用,但该作用弱于激酶的作用。

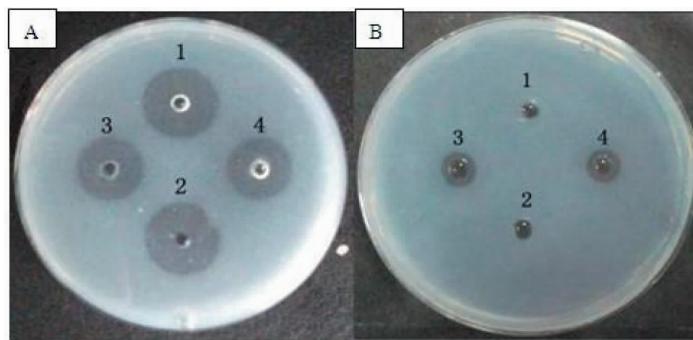


图 1 标准平板(A)及加热平板(B)中 SNFE 的溶栓作用方式测定

Fig. 1 Fibrin plate assay on plasminogen rich wells (A) and plasminogen free wells (B)

注:1、2 孔是 250 IU/mL 尿激酶,3、4 孔是 250 μg/mL SNFE

Note: Wells 1-2 contain urokinase (250 IU/mL), Wells 3-4 contain SNFE (250 μg/mL)

2.2 水解纤维蛋白原活性测定

纤维蛋白原是血栓形成的原料,可在凝血酶的作用下转变成纤维蛋白,直接参与凝血过程,是血栓栓塞相关疾病的危险因素。将纤维蛋白原制成一定浓度的溶液,然后加入凝血酶使纤维蛋白原变成纤维蛋白形成凝胶,离心分离取上清液,其中的蛋白为不可凝固蛋白,利用紫外分光光度法在 280 nm 可测定蛋白含量。SNFE 降解纤维蛋白原后上清液中的不可凝固蛋白增加,吸光度亦增加,可用公式计算剩余凝血酶可凝纤维蛋白原含量。实验结果显示,随着时间延长,SNFE 降解纤维蛋白原的量逐渐增加,剩余凝血酶可凝纤维蛋白原的量减少。SNFE 孵育 5、15、30、60 min 后,剩余凝血酶可凝纤维蛋白

原的含量分别为原来的 (67 ± 3.12)%、(42 ± 3.51)%、(33 ± 1.86)% 和 (14 ± 1.47)%。空白对照组孵育 60 min 后,剩余凝血酶可凝纤维蛋白原的含量分别为原来的 (85 ± 2.32)%。SNFE 组与对照组比较,均有显著差异 ($n = 3$, $P < 0.05$)。说明 SNFE 对纤维蛋白原有溶解作用。

2.3 SNFE 对血凝块的溶栓作用

生理盐水组溶栓前后血凝块形状、质地及溶液颜色均无明显变化,SNFE 和尿激酶溶栓后,血凝块质地松散,体积减少,溶液明显红染,随着方格星虫纤溶酶作用浓度的提高,其溶解血凝块的能力增强。低、中、高三个浓度的 SNFE 6 h 血凝块溶解率分别为 (61.20 ± 1.21)%、(65.22 ± 2.45)%、(71.47 ±

2.34% , 尿激酶组(250 IU/mL)和生理盐水组6 h 血凝块溶解率分别为($39.02 \pm 1.19\%$)和($4.12 \pm 0.36\%$) , SNFE 各剂量组与生理盐水组比较有明显差异($n = 3, P < 0.05$)。说明 SNFE 对血凝块具有明显的溶解作用。

2.4 出血活性测定

纤溶酶原激活剂可能会引起出血的副作用,限

制其在临床的应用,为此研究 SNFE 的出血活性。结果显示,各组小鼠皮下给药后24 h 内观察,生命体征均无异常。24 h 后剪下小鼠背部皮肤观察结果如图2 所示,与生理盐水溶媒对照组相比,五步蛇毒纤溶酶组有明显出血点,SNFE 无明显的出血斑点;SNFE 与五步蛇纤溶酶不同,为非出血性蛋白。



图2 生理盐水溶媒组(A)、五步蛇纤溶酶组(1 mg/mL)(B)及 SNFE 组(1 mg/mL)(C)的出血活性测定

Fig. 2 Hemorrhagic activity of saline (control) (A), *A. acutus* venom (1 mg/mL) (B) and SNFE (1 mg/mL) (C)

2.5 溶血活性测定

6 支试管均红细胞下沉,上层液澄清,未见明显红色。SNFE 各组随着剂量的增加,540 nm 处的吸光度并没有明显的变化,与空白对照组比较,各剂量

组无明显差异($P > 0.05$, 见表2)。实验结果说明各剂量组 SNFE 均不能使红细胞破裂,引起溶血从而使吸光度增加,即 SNFE 无溶血活性。

表2 SNFE 的溶血活性测定($\bar{x} \pm S, n = 3$)

Table 2 The thromblysis effect of SNFE ($\bar{x} \pm S, n = 3$)

管号 Tube No.	SNFE (μg)	生理盐水 Normal saline (mL)	2% 红细胞悬液 2% red blood cell suspension (mL)	$A_{540\text{nm}}$
1	25	2.4	2.5	0.104 ± 0.003
2	50	2.3	2.5	0.100 ± 0.004
3	75	2.2	2.5	0.107 ± 0.005
4	100	2.1	2.5	0.108 ± 0.002
5	125	2	2.5	0.102 ± 0.001
6	-	2.5	2.5	0.105 ± 0.003

参考文献

- Shen XR(沈先荣), Jiang DW(蒋定文), Jia FX(贾福星), et al. Study on anti-senescence effect of *Sipunculus Nudus* preparation. *Chin J Marine Drugs*(中国海洋药物), 2004, 1:30-32.
- Shen XR(沈先荣), Jiang DW(蒋定文), Jia FX(贾福星), et al. The anti-fatigue effect of *Sipunculidae* preparation on mice. *Chin J Nautical Med Hyperbaric Med*(中华航海医学

- Huang YL(黄玉良), Huang Q(黄群), Huang ZY(黄哲元), et al. Effect of Fufangxiongchong Koufuye to immunologic function in mice. *J Fujian Coll TCM*(福建中医学院学报), 1998, 8(2):32-33.
- Chen XX(陈细香), Li XY(林秀雁), Lu CY(卢昌义), et al. Advances on research of *Sipunculus*. *Marine Sci*(海洋科学), 2008, 32(6):66-70.

(下转第 1844 页)