

# 纳豆激酶 NK-01 的体内吸收研究

潘霞<sup>1</sup>, 滕潞瑶<sup>1</sup>, 梁鹏宇<sup>1</sup>, 任宇豪<sup>1</sup>, 刘伟治<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国海洋大学海洋生命学院; <sup>2</sup>青岛海洋科学与技术国家实验室, 青岛 266001

**摘要:** 本实验以研究纳豆激酶 NK-01 在大鼠肠道的吸收情况为目的, 首先通过体外外翻肠囊法初步证实 NK-01 可以穿过大鼠肠道而被吸收。在此基础上, 基于 FITC 标记 NK-01, 通过十二指肠注射, 检测大鼠血浆中 NK-01 的酶活与荧光强度。结果发现 FITC 标记的 NK-01 注射到大鼠的十二指肠后, 2 h 时大鼠血浆中能够检测到明显的酶活与荧光强度; 4 h 时大鼠血浆中的酶活与荧光强度均达到最大值; 4 h 后开始下降。同时, 在大鼠体内荧光强度与酶活变化一致, 因此可通过荧光强度的变化表征其在体内的代谢情况, 这为后续纳豆激酶代谢机制的深入研究提供了一种新方法。

**关键词:** 纳豆激酶; 十二指肠; 吸收; 荧光标记

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.030

## Study on Absorption of Nattokinase NK-01 *in vivo*

PAN Xia<sup>1</sup>, TENG Lu-yao<sup>1</sup>, LIANG Peng-yu<sup>1</sup>, REN Yu-hao<sup>1</sup>, LIU Wei-zhi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Marine Life Sciences, Ocean University of China; <sup>2</sup>Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266001, China.

**Abstract:** We studied the absorption of nattokinase NK-01 in the intestine of rats. The absorption of NK-01 was verified by the everted gut sacs method *in vitro*. Based on this, NK-01 was labelled with FITC, and injected into duodenum of rats. Then, enzyme activity and fluorescence intensity of FITC-NK-01 were measured in rat plasma, which could reflect the absorption of NK-01 *in vivo*. After treated with FITC-NK-01, the enzyme activity and fluorescence intensity were detected in plasma of rats at 2 h. At 4 h, the enzyme activity and fluorescence intensity in the rat plasma reached a maximum, and then began to decline. Meantime, the change of fluorescence intensity is consistent with the enzyme activity of the FITC-labeled NK-01 in the rat. Therefore, the metabolism of NK-01 can be characterized by the change of fluorescence intensity *in vivo*, which provides a new method for the metabolic and quantitative studies of it *in vivo*.

**Key words:** Nattokinase; duodenum; absorption; fluorescence labeling

纳豆是一种传统的发酵食品, 已在亚洲地区消费了数千年。纳豆在发酵的过程中产生了多种活性物质, 如纳豆激酶、异黄酮、超氧化物歧化酶、 $\gamma$ -多聚谷氨酸等, 这些活性物质赋予了纳豆预防血栓、降血脂等生物学活性<sup>[1,2]</sup>, 因此纳豆作为一种功能性食品和膳食补充剂一直深受人们欢迎。其中, 纳豆的发酵产物之一纳豆激酶, 是日本科学家须见洋行发现并命名的一种丝氨酸蛋白酶<sup>[3]</sup>。研究发现, 纳豆激酶具有良好的溶栓活性, 能够直接或间接溶解血栓<sup>[4]</sup>, 也能够提高血浆纤溶活性, 抑制血栓的形成。同时, 最近研究发现纳豆激酶也具有预防动脉粥样硬化、降低血压、抗氧化等重要生物学活性<sup>[5-8]</sup>。因

此, 纳豆激酶可以作为有益于心血管健康的膳食补充剂。但是, 关于纳豆激酶的药代动力学和药效学性质目前尚不清楚。

实验室前期筛选得到一株纳豆激酶枯草芽孢杆菌, 通过液体发酵培养可获得具有高酶活的发酵液。发酵液经分离纯化获得具有一定纯度的由多个片段组成的纳豆激酶(NK-01), 纤维平板法证明 NK-01 具有较高的活性<sup>[9]</sup>。

本实验旨在研究大鼠肠道对 NK-01 的吸收; 同时通过异硫氰酸荧光素(FITC)标记 NK-01, 研究 NK-01 在大鼠体内吸收情况。FITC 能够与赖氨酸的伯胺基反应而对蛋白质进行荧光标记, 是一种常见的荧光素类标记物。蛋白经 FITC 标记后, 可进行目标蛋白的准确定位和定量研究。相关研究为后续 NK-01 在体内的代谢以及定量分析奠定了基础。

收稿日期: 2018-04-02 接受日期: 2018-05-03

基金项目: 山东省重点研发计划基金(2017YYSP034)

\* 通讯作者 Tel: 86-018954223282; E-mail: liuweizhi@ouc.edu.cn

## 1 材料与试剂

实验动物: SD 大鼠雄性, 300 g, 7 周龄, 许可证号: SCXK(苏) 2015-0001, 购自青岛大壬富成动物养殖公司。

台式液: NaCl 8.0 g, 10% KCl 2.0 mL, 10% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.6 mL, 5% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 1.3 mL, NaHCO<sub>3</sub> 1 M, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mL, 葡萄糖 1.0g, 定容至 1L;

PBS 缓冲液: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.29 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g, pH 7.0。

戊巴比妥钠 (Solarbio, 北京); FITC (Sigma, USA)。其余试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

## 2 实验方法

### 2.1 NK-01 的体外吸收

根据 Wiseman 等<sup>[10]</sup>的方法制备外翻肠囊模型: 大鼠称重后戊巴比妥钠(3% (w/v), 1 mL/kg)麻醉, 固定。腹部剃毛, 打开腹腔, 幽门下方取长约 5 cm 的十二指肠, 37 °C 台式液冲洗。玻璃棒将肠囊外翻, 并结扎一端, 向肠囊内加入 1 mL 台式液溶液。

将大鼠随机分为两组, 每组 6 只。实验组将处理后的十二指肠置于溶于台式液的 NK-01 溶液中, 对照组置于等体积的台式液中, 37 °C, 50 rpm 震荡。分别在 0.5、1、2、3 h 从肠囊内取样 200 μL, 补充等体积台式液, 酪蛋白法检测样品活性<sup>[11]</sup>。

### 2.2 FITC 标记 NK-01

NK-01 溶解于 pH 9.0 碳酸盐缓冲液中至浓度为 20 mg/mL, 3 mg FITC 溶于 200 μl DMSO, 两种溶液混匀, 4 °C 避光标记 24 h, 15 000 g, 4 °C 离心 10 min。HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 预装柱 (GE healthcare) 分离混合溶液。分离过程为: 取 2 mL 标记后样品上样, PBS 溶液以 0.5 mL/min 的流速洗脱, 洗脱的蛋白透析至超纯水中 2 h, 冷冻干燥, Tricine-SDS-PAGE 检测, 得到标记后样品 FITC-NK-01。

根据 F/P 公式检测样品标记的效率<sup>[12]</sup>。

$$C = (M_w * E_{0.1\%}) / (389 * 195)$$

$$F/P = A_{495} * C / (A_{280} - 0.35 * A_{495})$$

其中, E<sub>0.1%</sub> 为 280 nm 处 1 mg/mL 未标记蛋白的吸光度, M<sub>w</sub> 为蛋白质的分子量, A<sub>495</sub> 为标记后样品在 495 nm 处的吸光度, A<sub>280</sub> 为标记后样品在

280 nm 处的吸光度。

### 2.3 FITC-NK-01 在大鼠体内的吸收情况

根据 Fujita 等<sup>[13]</sup>的方法进行十二指肠注射。称重后, 腹腔注射戊巴比妥钠(3%, 1 mL/kg)进行大鼠麻醉, 固定。大鼠腹腔左上方靠近胃的位置剪开大约 5 cm 的开口, 向十二指肠注射一定量样品溶液。缝合伤口, 止血粉止血。

将大鼠分为两组, 每组 6 只。实验组大鼠十二指肠注射 0.5 mL FITC-NK-01 溶液, 对照组注射 0.5 mL 生理盐水。2、4、6、8 h 后取血 2 mL, 4 °C 静置凝固后 3,000 g 离心 10 min, 吸取上层血浆。检测两组血浆样品的荧光强度与酶活。

## 3 结果

### 3.1 外翻肠囊检验 NK-01 的体外吸收

如图 1 所示, 30 min 后实验组肠囊内液体中已经检测到 NK-01 的活性; 随时间增加, 3 h 内 NK-01 活性不断上升。而 3 h 内对照组的肠囊内液中没有检测到 NK-01 的活性。这初步表明 NK-01 能够穿过大鼠十二指肠。

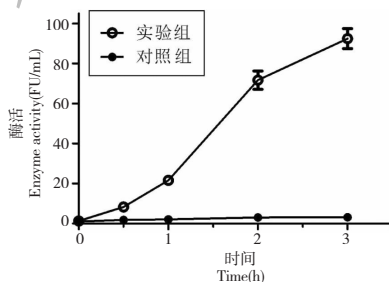


图 1 外翻肠囊法内外液酶活变化图

Fig. 1 Changes of Enzyme activity in the inner and outer fluid of everted intestinal sac

### 3.2 FITC 标记 NK-01

FITC 与 NK-01 结合后, 在凝胶过滤色谱图中出现两个不同的峰 1、2 (图 2 A)。根据 Tricine-SDS-PAGE 结果 (图 2 B), 峰 1 为标记后 NK-01, 峰 2 为未标记的 FITC。

同时, 冻干后样品的 F/P 平均值为  $0.68 \pm 0.09$ , 满足 0.3 ~ 1 之间<sup>[12]</sup>, 说明大多数 NK-01 被 FITC 标记, 满足后续实验要求。

### 3.3 FITC-NK-01 在大鼠体内的吸收情况

十二指肠注射 FITC-NK-01 后 2、4、6、8 h 取大鼠血浆, 测得酶活与荧光强度如图 3-3 所示。实验组在注射 2 h 后血浆中检测到明显酶活 (图 3 A)

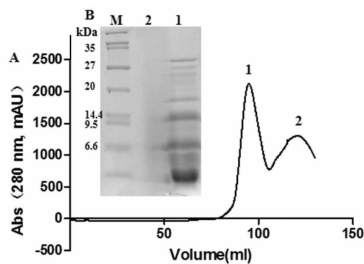


图2 FITC 标记后 NK-01 凝胶过滤色谱图

Fig. 2 The result of NK-01 labelled with FITC

注:A. FITC 标记后 NK-01 凝胶过滤色谱图; B. 峰 1、2 对应的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图。

Note:(A) Gel filtration chromatogram of NK-01 after FITC labeling, (B) The tricine-SDS-PAGE analysis of gel filtration, M:protein marker, line1 and line 2 are the peak 1 and peak 2 of gel filtration chromatogram)

与荧光强度(图 3 B),两个指标在 4 h 均达到峰值;之后随着时间的延长,酶活与荧光强度开始降低。注射后 8 h 实验组血浆中仍能检测到明显的酶活和荧光强度。对照组的两个指标均几乎无变化。

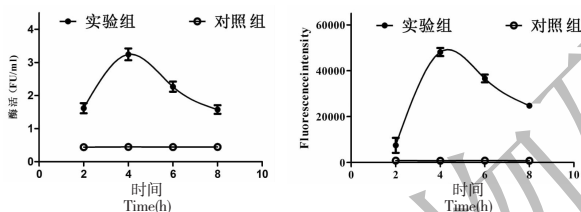


图3 FITC-NK-01 十二指肠注射后大鼠血浆酶活与荧光强度变化情况

Fig. 3 The changes of enzyme activity and fluorescence intensity of plasma in rat after injected FITC-NK-01

## 4 讨论

之前对纳豆激酶体内吸收的研究方法多为 Western blotting、ELISA 等。通过 Western blotting 的方法,使用纤维蛋白原  $\gamma$  链抗体检测血浆中的纤维蛋白降解产物并且纳豆激酶在酸性条件下不稳定易失活<sup>[3]</sup>,因此 Fujita 等人通过向大鼠十二指肠注射的方法,研究纳豆激酶的肠道吸收情况,发现 3 h 后大鼠血浆中能够检测到纤维蛋白原降解片段<sup>[13]</sup>,这表明纳豆激酶可以通过肠道吸收并发挥纤溶作用。段智变等人,向兔十二指肠注射纳豆激酶,通过 ELISA 的方法,1.5 h 后血浆中检测到了纳豆激酶,2 h 后达到峰值并开始下降<sup>[14]</sup>。Michael Ero 等人发现正常人服用纳豆激酶胶囊后,13.5 h 时人体血清

中纳豆激酶水平达到峰值<sup>[15]</sup>。

本实验首次利用 FITC 荧光标记的方法研究了 NK-01 在大鼠体内经肠道吸收情况。用荧光标记物 FITC 对 NK-01 进行标记,通过检测给药后不同时间大鼠血浆中酶活与荧光强度的变化,对 NK-01 在进入肠道后的吸收情况进行表征。结果表明, NK-01 能够被大鼠肠道吸收,给药 2 h 后,血浆中有明显酶活与荧光强度;4 h 时达到峰值,之后开始下降;并且,血浆酶活和荧光强度的变化趋势一致。这之前纳豆激酶肠道吸收的研究结果基本相一致,尽管达到峰值的时间不同,这可能是给药的剂量和实验动物不同的原因。研究发现给药 8 h 后体内仍可以检测 NK-01 的活性,这提示纳豆激酶在体内发挥作用时间长。基于 FITC 标记的方法,通过酶活和荧光强度的变化对 NK-01 的吸收情况进行研究,为后续 NK-01 在体内的代谢和定量研究提供了一种新方法。

## 参考文献

- 1 Wang S, Wang Y, Pan MH, *et al.* Anti-obesity molecular mechanism of soy isoflavones:weaving the way to new therapeutic routes[J]. *Food Funct*,2017,8:3831-3846.
- 2 Murooka Y, Yamshita M. Traditional healthful fermented products of Japan[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*,2008,35:791-798.
- 3 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.
- 4 Fujita M, Hong K, Ito Y, *et al.* Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat[J]. *Biol Pharm Bull*,1995,18:1387-1391.
- 5 Weng Y, Yao J, Sparks S, *et al.* Nattokinase: An oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(3):11-15.
- 6 Ren NN(任妮娜), Chen HJ(陈鸿杰), Li Y(李跃), *et al.* A clinical study on the effect of nattokinase on carotid artery atherosclerosis and hyperlipidaemia[J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志),2017,97:2038-2042.
- 7 Kim JY, Gum SN, Paik JK, *et al.* Effects of nattokinase on blood pressure;a randomized, controlled trial[J]. *Hypertens Res*,2008,31:1583-1588.
- 8 Pais E, Alexy T, Holsworth RJ, *et al.* Effects of nattokinase, a pro-fibrinolytic enzyme, on red blood cell aggregation and whole blood viscosity[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*,2006,35:139-142.