

[文章编号] 1006-9674(2003)01-005-04

纳豆素对大鼠腹主动脉血栓形成的抑制作用

吴胜英¹, 钟光珍², 董献红³, 任永生¹, 梁学军⁴, 唐朝枢²¹ 郧阳医学院病理生理学教研室, 湖北十堰 442000; ² 北京大学第一医院心血管研究所³ 河南省新乡医学院生理学教研室; ⁴ 北京大学医学部公共卫生系)

[摘要] 目的: 在复制大鼠血栓模型上, 通过动态观察血压的变化、比较血栓的大小以及检测纤溶酶原激活物抑制物(PAI)、组织型纤溶酶原激活物(tPA)活性等指标, 观察纳豆素的溶栓效应。方法: S-D大鼠随机分五组($n=40$), 用不同浓度的纳豆素灌胃, 同等剂量的蚓激酶设为阳性对照, 用 Powerlab/4s 生理多导仪描记股动脉血压, 血栓干重用考马斯亮蓝法蛋白定量, 采用酶联免疫法测定血浆中 PAI 及 tPA 活性。结果: 纳豆素组与对照组、单纯血栓组相比, 复制血栓前血压无显著性差异($P>0.05$), 血栓复制后 40 min, 纳豆素组、蚓激酶组血压下降幅度($-11.62\pm 7.36\%$ 、 $-8.37\pm 10.29\%$ 、 $-7.28\pm 4.54\%$)与单纯血栓组血压下降幅度($-59.97\pm 12.29\%$)相比具有显著性差异($P<0.01$); 纳豆素处理的动物与单纯血栓组动物比较, 其血栓的湿重、干重、蛋白含量显著性降低($P<0.01$); 纳豆素组、蚓激酶组血浆中 tPA 活性升高, PAI/tPA 比值与对照组相比显著降低($P<0.01$)。结论: 纳豆素抑制动脉血栓的形成, 提高纤维蛋白溶解活性。

[关键词] 纳豆; 血栓形成; 溶栓; 主动脉, 腹; 大鼠

[中图分类号] R378.99

[文献标识码] A

The effect of Nattokinase on the thrombosis formation of abdominal aorta in rat WU Sheng-Ying¹, ZHONG Guang-Zhen², DONG Xian-Hong³, et al. (¹Department of Pathophysiology, Yunyang Medical College, Shiyan, Hubei Province, 442000; ²Department of Physiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083)

Abstract: Objective To study the effect of Nattokinase on the thrombus formation in the thrombus model, the change of blood pressure, the size of thrombus and the activity of plasminogen activator inhibitor (PAI) or tissue plasminogen activator (tPA) were measured. Methods Before making thrombus model by coating the abdominal aorta with filter paper soaked in 30% FeCl₃, S-D rats were divided into five groups randomly, fed with Nattokinase or Lumbrukinase or normal chow respectively for two days. The femoral artery pressures were traced by Powerlab/4s. The protein contents of the thrombus were determined by Bradford method. The PAI and tPA activity were detected by ELISA. Results The decreased level of femoral artery pressure of the rats fed with Nattokinase or Lumbrukinase were lower ($-11.62\pm 7.36\%$ 、 $-8.37\pm 10.29\%$ 、 $-7.28\pm 4.54\%$) than that of the rats fed with normal chow ($-59.97\pm 12.29\%$, $P<0.01$). The wet weight, dry weight or the protein content of the thrombus were significantly lower on the rats fed with Natto than that on the rats fed with normal chow ($P<0.01$). The tPA activity increased while the PAI/tPA ratio decreased significantly in plasma of the rats fed with Nattokinase or Lumbrukinase, compared with that in plasma of the rats fed with normal chow ($P<0.01$). Conclusion Nattokinase can inhibit the formation of thrombus and promote the fibrinolysis activity in plasma.

Key words: natto, thrombosis, thrombolysis; aorta, abdominal; rats

血栓形成是引起心肌梗死、脑卒中等心脑血管疾病死亡的重要因素, 抑制血栓形成和增强纤溶活性对心脑血管疾病防治具有重要意义。从膳食成分中发现和开发抗栓和溶栓物质, 具有广泛的临床实

用价值。日本食品纳豆(Natto), 类似于我国的豆豉, 以大豆为原料, 经发酵(主要为纳豆菌, 即枯草杆菌 *Bacillus subtilis*)作用后生成。大量实验和临床资料表明, 纳豆食品不仅营养丰富, 而且对心脑血管疾病^[1]、骨质疏松^[2]等均有一定的预防和治疗效果。1987年 Sumi 等^[3]人从纳豆中提纯出纳豆激酶(Nattokinase), 发现其能激活纤维蛋白溶解酶, 发挥溶栓作用, 但纳豆的溶栓效应机理尚未完全阐明。

[作者简介] 吴胜英(1966-), 女, 湖北十堰市人, 学士, 讲师, 郧阳医学院病理生理学教研室, 现从事心血管病理生理学的研究。

本工作作用纳豆的粗提物纳豆素在大鼠的血栓模型上,观察其对血栓形成的影响,以探讨纳豆的作用机理及临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性S-D大鼠40只,体重200~250g左右,由北大医学部动物中心提供;纳豆素由北京大学医学部公共卫生系提供;蚓激酶购于北京百奥药业有限责任公司,京卫药准(1996)第127002号;PAI、tPA试剂盒购自上海实业——医大生物技术有限公司;其它试剂为市售分析纯。

1.2 大鼠血栓模型制作及实验分组

参照Kurz等^[4]方法复制动脉血栓形成模型,大鼠禁食8h,自由饮水,用20%乌拉坦腹腔注射(5ml/kg)麻醉,股动脉插管经换能器在生理多导仪上监测股动脉血压,腹正中切口,游离约2cm长的腹主动脉,用30%FeCl₃浸渍过的滤纸(1cm×1cm)仔细包裹腹主动脉(小心保护周围组织),30min后去除滤纸条,观察10min后结束实验。

实验分组:①单纯血栓组(A组):操作见上述;②低剂量纳豆素组(B组):预先用纳豆素30mg/(kg·次),2次/日灌胃,连续两日,血栓制备同第一组;③高剂量纳豆素组(C组):纳豆素灌胃,剂量为300mg/(kg·次),2次/日,其它操作同前;④蚓激酶组(D组):方法同第二组,但用蚓激酶灌胃,剂量为30mg/(kg·次),2次/日;⑤对照组(E组):用生理盐水浸泡过的滤纸包裹腹主动脉,其操作同第一组。

1.3 监测指标

监测血栓制备前和后10min股动脉血压的变化;结束实验时,胸主动脉穿刺抽血5ml,3.8%枸橼酸钠液(含EDTA1mg/ml)抗凝,离心分离血浆,按试剂盒说明书,用酶联免疫吸附法测血浆PAI和

tPA活性;准确摘取滤纸覆盖的腹主动脉段的血栓,称其湿重,并在烤箱内(90℃过夜)彻底干燥后称其血栓干重,并将其溶于2mlNaHCO₃溶液中(0.1mol/LNaOH溶液中含2%Na₂CO₃),沸水浴3min,用考马斯亮蓝法蛋白定量,计算血栓的蛋白含量^[5](μg pro·mg⁻¹DW)。

1.4 统计学分析

数据处理数据以均值±标准差表示,用one-wayANOVA作统计学处理,组间比较用Student-Newman-Keuls(SNK)方法检验,P<0.05为差异有显著性。

2 结果

单纯血栓组动物股动脉血压在血栓复制后较血栓复制前降低60%(P<0.01),表明腹主动脉严重闭塞;药物治疗各组血栓制作后股动脉血压降低幅度较单纯血栓组明显轻微(P<0.01),接近对照组血压水平(P>0.05),各治疗组间差异无统计学意义(P>0.05)(见表1)。

表1 实验动物在复制前后股动脉血压变化

	n	复制前 (mmHg)	复制后 (mmHg)	变化幅度(%)
A	8	100±9.50	39±9.68	-59.97±12.29%
B	8	102±11.6	93±9.28**	-11.62±7.36%**
C	8	96±8.92	84±8.78**	-8.37±10.29%**
D	8	100±11.72	87±6.18**	-7.28±4.54%**
E	8	101±7.19	96±5.86	-5.5±2.6%

**P<0.01,与单纯血栓组相比

与单纯血栓组相比较,治疗各组血栓湿重、血栓干重和血栓蛋白含量均明显降低(P值均<0.01),高剂量纳豆素组与蚓激酶组血栓湿重均轻于低剂量纳豆素组(P<0.01),但两组间差异无统计学意义(P>0.05)(见表2)。

表2 各实验组血栓湿重、干重、蛋白定量(x±s)

	n	血栓湿重(mg)	血栓干重(mg)	蛋白定量(μg. pro/mg·DW)
A	8	28.63±0.98	7.27±0.98	926.79±73.23
B	8	24.95±3.11*	6.83±1.10*	855.11±70.06*
C	8	19.42±3.08***	5.67±0.45***	772.82±44.57***
D	8	19.68±2.55***	5.86±0.32***	740.44±50.98***
E	8	18.96±3.1	5.36±0.41	730.23±40.55

*P<0.05, **P<0.001,与单纯血栓组相比(A组); *P<0.01,与低剂量纳豆组相比(B组)

与对照组相比较,血栓形成既激活PAI也激活tPA(P均<0.01),PAI/tPA比值显著降低(P<0.01),表明内源性纤溶系统代偿激活。治疗各组PAI

水平明显低于单纯血栓组,而tPA水平显著高于单纯血栓组(P均小于0.01),PAI/tPA的比值进一步降低(P<0.01);纳豆素组与蚓激酶组差异无统计

学意义($P > 0.05$) (见图 1~3)

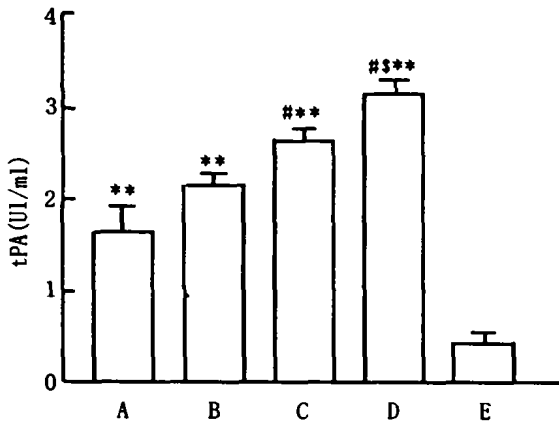


图1 纳豆激酶对 tPA 的影响

** $P < 0.001$ 与对照组相比(E组), * $P < 0.01$ 与单纯血栓组相比(A组), # $P < 0.01$ 与低纳豆组相比(具体分组见正文)

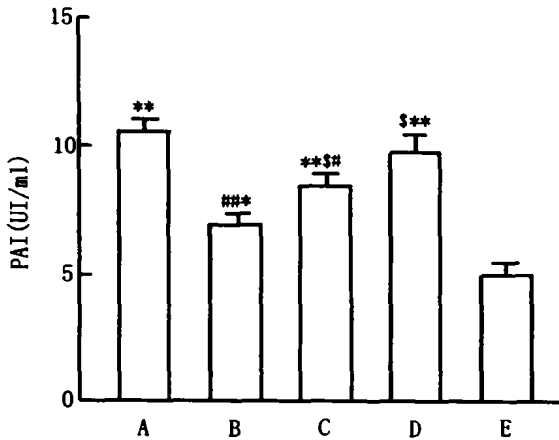


图2 纳豆激酶对 PAI 的影响

** $P < 0.01$ 与对照组相比(E组), ** $P < 0.01$ 与单纯血栓组相比(A组), # $P < 0.01$ 与低纳豆组相比(B组)。

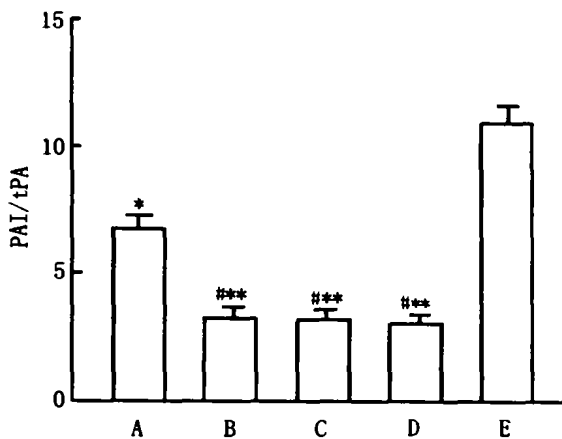


图3 纳豆激酶对 PAI/tPA 的影响

** $P < 0.001$ 与对照组相比(E组), * $P < 0.01$

与单纯血栓组相比(A组)。

3 讨论

纳豆是豆类食品经发酵后制成,富含蛋白质、氨基酸、维生素等多种营养成分,日本学者发现纳豆中含有 vitK、 γ -谷氨酸、异黄酮、纳豆激酶等多种生物活性物质。流行病学资料提示,纳豆具有广泛的生物学效应,尤其是对骨质疏松、心脑血管疾病和肿瘤等有一定的预防和治疗作用^[1,2]。Sumi H 等^[6]早在 1987 年从纳豆中分离纯化出纳豆激酶,分子量为 31.5 kD 属于丝氨酸蛋白酶,并证实其具有高效溶栓效应。纳豆激酶(NK)的溶栓作用,在狗血栓模型(经股静脉注入牛纤维蛋白原和牛的凝血酶)上,通过口服纳豆活酶胶囊,采用照相术观察其溶栓效应,结果发现栓塞的血管再通。健康人口服纳豆激酶后 2~8 h 活性最高,优球蛋白溶解时间(ELT)明显缩短,纤维蛋白降解产物(FDP)、tPA 提高^[7];对冠心病的病人,晚饭时口服纳豆激酶可预防次日发生心肌梗塞;临床观察还发现行瓣膜置换术后病人在行抗凝治疗时,纳豆与华法令有协同效应^[4];说明口服纳豆激酶可提高纤溶活性,预防和治疗血栓性疾病。

本实验用临床上常用的口服溶栓药物蚓激酶作为阳性对照;用 30% FeCl_3 浸润的滤纸条覆盖大鼠腹主动脉,通过氧自由基的产生,造成血管内膜脂质过氧化损伤,激活内源性凝血系统,促使血管内血栓形成。通过动态检测股动脉血压,发现单纯血栓组动物的股动脉血压明显下降(反映腹主动脉闭塞),富含蛋白的血栓形成,与文献报道一致^[4]。实验各组间复制血栓前股动脉血压无显著性差异($P > 0.05$);血栓复制后 40 min,纳豆素组、蚓激酶组与单纯血栓组相比,股动脉血压下降幅度显著低于单纯血栓组。此外,纳豆素组与单纯血栓组比较,经纳豆素处理的动物其血栓的湿重、干重、蛋白量降低。结果表明纳豆素明显抑制大鼠腹主动脉血栓形成,其效果与蚓激酶组没有显著性差异。血栓形成(单纯血栓组)既激活 PAI 也激活 tPA, tPA、PAI 均高于对照组,而 PAI/tPA 显著减少($P < 0.01$),表明内源性纤溶系统激活。低、高浓度纳豆素组血浆 tPA 活性高于对照组、单纯血栓组,而与蚓激酶组相比较具

有同等的效应;低、高浓度纳豆素组血浆 PAI / tPA 的比值明显低于对照组、单纯血栓组;而与蚓激酶组无差异。

纳豆的抗栓机制尚未完全阐明,tPA、PAI 是纤溶系统关键物质,tPA 和 PAI 主要由血管内皮细胞合成和释放,tPA 通过激活纤溶酶原而启动纤溶过程,PAI 为 tPA 的快速抑制物。tPA 活性升高和/或 PAI 活性降低可导致纤溶功能升高。Urano T 等^[9]发现纳豆激酶可裂解活性重组的原核 PAI-1 (rpPAI-1),从而导致 rpPAI-1 活性丧失。无论是否存在 rpPAI-1,纳豆素均可呈剂量依赖性地增加纤维蛋白溶解活性。在没有 rpPAI-1 时,NK 可直接增加纤维蛋白溶解活性;而当 rpPAI-1 存在时,纤维蛋白溶解活性的激活似乎与 rpPAI-1 裂解失活有关,这可能是纳豆激酶增强纤溶的重要机制。本实验中,纳豆素组血中的 tPA 量显著升高,提示纳豆素可能通过激活 tPA,削弱或抑制 PAI 的活性而促使纤维蛋白溶解。

纳豆是一种常见的食品,其中的多种活性成份,分别具有抗栓和溶栓、预防和治疗骨质疏松、抗感染、抗肿瘤等多种生物学效应,且无明显毒副作用等特点,作为保健食品和药源的开发具有一定的临床参考价值。本实验中用纳豆的粗提物纳豆素,仅研究其溶栓机制,其它生物学效应尚待进一步证实。

[参 考 文 献]

- [1] Okamoto A, Hanagata H, Kawamura Y. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 1995, 47(1): 39-47.
- [2] Yamaguchi M, Kakuda H, Gao YH, *et al.* Prolonged intake of fermented soybean (natto) diets containing vitamin K2 (menaquinone-7) prevents bone loss in ovariectomized rats[J]. *J Bone Miner Metab*, 2000, 18(2): 71-76.
- [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): 110-111.
- [4] Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride[J]. *Thromb Res*, 1990, 60: 269-280.
- [5] [德]H. G 沃格尔 [美]W. H 沃格尔编著,杜冠华等译. *药理学实验指南——新药发现和药理学评价*[J]. 北京:科学出版社, 2001. 215-216.
- [6] 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.
- [7] 王正刚,丁贵平,蔡正森,等. 纳豆激酶的研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 1998, 19(6): 401-403.
- [8] Kudo T. Warfarin antagonism of natto and increase in serum vitamin K by intake of natto[J]. *Artery*, 1990, 17(4): 189-201.
- [9] Urano T, Ihara H, Umemura K, *et al.* The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* Cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 24690-24696.

[收稿日期] 2002-12-15