

# 中国黑眼镜蛇毒蛋白酶 natrahagin 抑制血小板聚集和 动脉血栓形成的作用

郭丹<sup>1</sup>, 吴曙光<sup>2</sup>, 陈娜娜<sup>2</sup>, 朱正光<sup>2</sup>

(第一军医大学 1. 南方医院药学部 2. 药物研究所, 广东 广州 510515)

**摘要** 研究从中国黑眼镜蛇毒中纯化的中国黑眼镜蛇毒蛋白酶 natrahagin 对血小板聚集、血浆纤维蛋白原水平和动脉血栓形成的影响。采用比浊法测定血小板聚集率, 双缩脲法测定血浆纤维蛋白原浓度。应用胰蛋白酶损伤血管内皮的方法制作家兔颈动脉血栓模型评价 natrahagin 抑制血栓形成的作用。结果发现, 新西兰家兔 natrahagin ( $0.025 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  iv) 剂量依赖性地抑制二磷酸腺苷 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和胶原 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 诱导的血小板聚集, 显著降低血浆纤维蛋白原水平。剂量为  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 血浆纤维蛋白原水平降低 33.3%, 并能有效地抑制兔颈动脉血栓的形成。效应呈剂量依赖性。  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组对血栓形成的抑制率达到 45.4%。研究提示, natrahagin 抑制动脉血栓形成的作用与其抑制纤维蛋白原介导的血小板聚集和降低血浆纤维蛋白原水平的作用有关。

**关键词**: 眼镜蛇毒; 蛋白酶; 纤维蛋白原; 血小板聚集

中图分类号: R977.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-300X(2001)01-0027-04

血栓栓塞性疾病是目前发病率和死亡率都很高的一类疾病, 临床上能有效治疗这类疾病的药物还为数不多。蛇毒作为天然的药用资源, 含有许多活性成分, 包括多种蛋白酶和多肽, 广泛影响血液的凝固和血小板的粘附、聚集与释放以及血栓的形成<sup>[1,2]</sup>。作者从中国黑眼镜蛇 (*Naja naja atra*) 毒中分离纯化出一种具有纤维蛋白原水解活性的蛋白原酶 natrahagin<sup>[3]</sup>, 并证明它在体外可选择性地水解纤

维蛋白原的 A $\alpha$  和  $\gamma$  链<sup>[4]</sup>。本文旨在研究 natrahagin 体内给药对血小板聚集和血浆纤维蛋白原浓度以及动脉血栓形成的影响, 为寻找新型抗血栓药物提供有价值的实验资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

Natrahagin 由第一军医大学药物研究所从中国黑眼镜蛇粗毒(由广州医学院蛇毒研究所提供)分离纯化而得(毛细管电泳检测纯度  $> 90\%$ ), 本实验所用的 natrahagin 均为同一批。生理盐水溶解配成所需剂量。胰蛋白酶, 香港 Farco 公司。二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP), 胶原, 美国 Sigma 公司。新西兰家兔  $\sigma$   $\pm$  不限, 体重 ( $2.52 \pm 0.42$ ) kg, 由第一军医大学实验动物中心提供。SPA-4 血小板聚集仪, 上海科达测试仪器厂。DU530 紫外分光光度计, 美国 Beckmen 公司。

### 1.2 富血小板血浆的制备<sup>[5]</sup>

新西兰家兔耳缘静脉 iv natrahagin 后 2 h 从心脏穿刺取血 3.0 mL, 与 3.8% 枸橼酸钠混合 (9:1, V/V), 室温下  $200 \times g$  离心 10 min, 取上层血浆,  $162 \times g$  再离心 10 min, 除去残余红细胞, 即为富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP)。下层红细胞再经  $2000 \times g$  离心 10 min, 上清液为贫血小板血浆 (platelet-poor plasma, PPP)。

### 1.3 血小板聚集率的测定

比浊法测定血小板聚集率<sup>[6]</sup>。用 PPP 将 PRP 血小板数目调至  $3 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 。取 PRP 200  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  搅拌 1 min, 加入诱导剂 ADP (终浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和胶原 (终浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 在 SPA-4 型血小板聚集仪上描记聚集曲线。

### 1.4 双缩脲法测定血浆纤维蛋白原水平<sup>[7]</sup>

新西兰家兔 iv natrahagin 后 2 h 从心脏穿刺取血 3.0 mL, 与 3.8% 枸橼酸钠混合 (9:1, V/V), 室温下

来稿日期 2000-01-03 收稿日期 2000-09-07

作者简介 郭丹 (1971 - ), 男, 湖南省湘潭人, 药师, 医学硕士, 主要从事心血管药理研究。

200 × g 离心 5 min 分离血浆. 用双缩脲法在 DU530 紫外分光光度计上进行血浆纤维蛋白原含量的测定.

1.5 新西兰家兔颈动脉血栓模型的制作

参照文献<sup>[8]</sup>方法, 略作改进. 新西兰家兔用 3% 戊巴比妥钠(20 mg·kg<sup>-1</sup>) iv 麻醉. 暴露右侧颈总动脉约 2.5 cm, 用显微外科动脉夹夹住近心端和远心端, 两端分别插入 8 号针头, 于针头进入部位结扎血管, 两结扎线相距 1.5 cm. 经近心端针头用输液泵匀速(0.6 mL·min<sup>-1</sup>)灌注 1.0% 胰蛋白酶 15 min, 随后以相同速度灌注生理盐水冲洗, 灌注液经远心端排出. 拔出针头并用无创伤性针线缝合针孔, 打开动脉夹使血流复通. Natrahagin 低剂量(0.025 mg·kg<sup>-1</sup>), 中剂量(0.05 mg·kg<sup>-1</sup>)以及高剂量(0.1 mg·kg<sup>-1</sup>)和对照用生理盐水分别在血流复通前 1 h 由新西兰家兔耳缘静脉 iv 给药. 血流复通 1 h 后剪下血管, 于损伤内皮的血管壁处可见血栓附着, 仔细取出后立即称其湿重.

1.6 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 进行成组 *t* 检验.

2 结果

2.1 Natrahagin 抑制血小板聚集

与生理盐水对照组比较, natrahagin 低剂量(0.025 mg·kg<sup>-1</sup>), 中剂量(0.05 mg·kg<sup>-1</sup>)以及高剂量(0.1 mg·kg<sup>-1</sup>) iv 2 h 后, 对 10 μmol·L<sup>-1</sup> ADP 和 100 mg·L<sup>-1</sup> 胶原诱导的兔血小板聚集均表现为抑制作用, 效应呈剂量依赖性(图 1). 3 组剂量对 ADP 诱导的血小板聚集的抑制率分别为 6.2%, 44.6% 和 72.1%, 对胶原诱导的血小板聚集的抑制率分别为 30.9%, 62.4% 和 70.5%.

2.2 Natrahagin 降低血浆纤维蛋白原浓度

Natrahagin 3 组剂量 iv 2 h 后, 家兔血浆纤维蛋白原含量均显著下降, 效应呈浓度依赖性(表 1). 剂量为 0.1 mg·kg<sup>-1</sup> 时血浆纤维蛋白原浓度降低 33.3%.

2.3 Natrahagin 对兔颈动脉血栓形成的影响

新西兰家兔分别 iv 生理盐水和 natrahagin 后, 制作颈动脉血栓模型并称量血栓湿重. 表 2 结果显示, 与阴性对照组相比, natrahagin 给药组血栓湿重均显著减轻, 效应呈浓度依赖性. 0.1 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组对血栓形成的抑制率达到 45.4%.

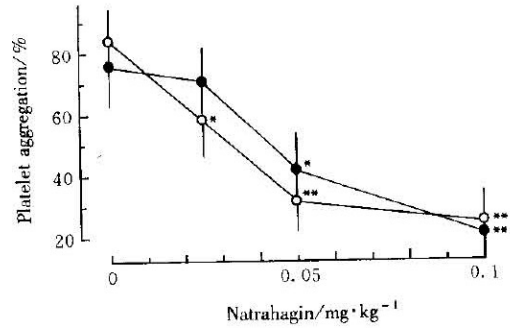


Fig 1. Effect of natrahagin on platelet aggregation induced by ADP or collagen in rabbit platelet-rich plasma. The rabbits were intravenously injected with natrahagin (0.025, 0.05 and 0.1 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively). Two hours after injection, platelets were prepared and stimulated with ADP (● 10 μmol·L<sup>-1</sup>) or collagen (○ 100 mg·L<sup>-1</sup>).  $\bar{x} \pm s$ , *n* = 6. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01, compared with corresponding 0 mg·kg<sup>-1</sup> group.

Tab 1. Effect of natrahagin on plasma fibrinogen concentration in rabbits

| Natrahagin/mg·kg <sup>-1</sup> | Fibrinogen concentration/g·L <sup>-1</sup> |
|--------------------------------|--|
| 0                              | 2.01 ± 0.18                                |
| 0.025                          | 1.68 ± 0.07**                              |
| 0.05                           | 1.48 ± 0.07**                              |
| 0.1                            | 1.34 ± 0.17**                              |

Fibrinogen concentration was determined in plasma by biuret method 2 h after iv natrahagin.  $\bar{x} \pm s$ , *n* = 6. \*\* *P* < 0.01, compared with 0 mg·kg<sup>-1</sup> group.

Tab 2. Effect of natrahagin on the rabbit carotid arterial thrombosis induced by endothelial cell damage

| Natrahagin/mg·kg <sup>-1</sup> | Thrombus weight/mg |
|--------------------------------|--------------------|
| 0                              | 9.4 ± 0.9          |
| 0.025                          | 7.4 ± 1.7*         |
| 0.050                          | 5.9 ± 1.4**        |
| 0.10                           | 5.1 ± 1.5**        |

Rabbit common carotid artery thrombosis was induced by injury of endothelium with 1.0% trypsin solution, and thrombotic clots was weighed 2 h after iv natrahagin.  $\bar{x} \pm s$ , *n* = 6. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01, compared with 0 mg·kg<sup>-1</sup> group.

### 3 讨论

Natrahagin 是从中国黑眼镜蛇毒中纯化出的纤维蛋白原水解酶,它在体外可迅速水解纤维蛋白原 A $\alpha$  链,逐渐水解  $\gamma$  链,对 B  $\beta$  链无影响,其作用方式有别于临床上使用的蝮蛇抗栓酶<sup>[9]</sup>,是一种新型的  $\alpha$ ,  $\gamma$ -纤维蛋白原酶. 朱正光等<sup>[3]</sup>曾发现, natrahagin 与血小板在体外共同温育 6 min,不影响 ADP 和胶原诱导的人血小板聚集,但当温育时间进一步延长至 15 min 时,血小板聚集受到显著抑制(未发表资料). 本实验发现, natrahagin (0.025 ~ 0.1 mg·kg<sup>-1</sup>) iv 2 h 后,能够显著抑制 ADP 和胶原诱导的兔血小板聚集,此结果提示体内外作用一致. 同样地, natrahagin 在体外作用 30 ~ 120 min 后,表现出显著的和逐渐增强的水解可凝固纤维蛋白原的活性<sup>[3]</sup>,而本文发现 natrahagin iv 2 h 后可有效地降低家兔血浆纤维蛋白原浓度. 本实验采用 Imura 等<sup>[8]</sup>的血栓动物模型评价 natrahagin 抑制动脉血栓形成的作用,用胰蛋白酶损伤兔颈动脉血管内皮,所形成的血栓富含血小板和纤维蛋白,类似于临床上动脉血栓形成的情况. 该模型中血小板功能活化是血栓形成的重要因素. Natrahagin iv 能够有效地抑制兔颈动脉血栓形成,其抗血小板聚集的活性无疑在其中发挥作用. 另一方面, natrahagin 显著降低血浆纤维蛋白原水平,从而影响纤维蛋白凝块的形成,达到抑制血栓形成的作用.

综上所述, natrahagin 在体内具有抑制动脉血栓形成的作用,该作用与其水解纤维蛋白原,从而导致纤维蛋白原介导的血小板聚集的抑制和血浆纤维蛋白原水平的下降有关. Natrahagin 是否能成为新型抗血栓药物有待更深入的研究.

### 4 参考文献:

- [1] Kini RM, Evans HJ. Effects of snake venom proteins on blood platelets[J]. *Toxicon*, 1990, **28**(12):1387 - 1422.
- [2] Chang MF, Lin HK, Peng HC, Huang TF. Antithrombotic effect of crotalin, a platelet membrane glycoprotein 1b antagonist from venom of *Crotalus atrox* [J]. *Blood*, 1998, **91**(5):1582 - 1589.
- [3] 朱正光, 吴曙光. 眼镜蛇毒纤维蛋白原溶解因子的纯化及理化性质的研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, **15**(5):782 - 786.
- [4] 朱正光, 吴曙光. 眼镜蛇毒蛋白酶 natrahagin 水解纤维蛋白原酶的特性及对人血小板聚集的影响[J]. 中国药理学报, 1999, **20**(10):944 - 947.
- [5] Tomita T, Umegaki K, Hayashi E. Basic aggregation properties of washed rat platelets: correlation between aggregation, phospholipid degradation, malondialdehyde, and thromboxane formation[J]. *J Pharmacol Methods*, 1983, **10**(1):31 - 44.
- [6] Brein JR. Platelet aggregation. II. Some effects result from a new method of study[J]. *J Clin Pathol*, 1962, **15**(5):452 - 457.
- [7] 赵允云. 蛋白质测定[A]. 见: 赵允云, 朱建国, 主编. 新编实验临床检验手册[M]. 福建: 福建科学技术出版社, 1995. 226.
- [8] Imura Y, Terashita Z, Nishikawa K. The role of thromboxane(TX) A<sub>2</sub> in rabbit arterial thrombosis induced by endothelial damage[J]. *Thromb Res*, 1990, **59**(1):195 - 205.
- [9] Chang MC, Huang TF. In vivo effect of a thrombin-like enzyme on platelet plug formation induced in mesenteric microvessels of mice[J]. *Thromb Res*, 1994, **73**(1):31 - 38.

## Effect of natrahagin, a cobra venom proteinase on platelet aggregation and arterial thrombosis

GUO Dan<sup>1</sup>, WU Shu-Guang<sup>2</sup>, CHEN Na-Na<sup>2</sup>, ZHU Zheng-Guang<sup>2</sup>

(1. Pharmaceutical Department of Nanfang Hospital, 2. Institute of Pharmaceutical Sciences, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** To study the effect of natrahagin, a

Chinese cobra venom proteinase purified from

*Naja naja atra* venom on platelet aggregation, fibrinogen level and artery thrombosis. Platelet aggregation was measured turbidimetrically and plasma fibrinogen level was determined by biuret method. Rabbit common carotid artery thrombosis induced by injury of endothelium treated with 1.0% trypsin solution was used to evaluate the antithrombotic effect of natrahagin. The results showed that intravenous injection of natrahagin (0.025, 0.05 and 0.1 mg·kg<sup>-1</sup>) dose-dependently inhibited rabbit platelet aggregation induced by 10 μmol·L<sup>-1</sup> of ADP or 100 mg·L<sup>-1</sup> of collagen. There was also a significant reduction in the plasma

fibrinogen level, with the 33.3% reduction at the dose of 0.1 mg·kg<sup>-1</sup>. The rabbit artery thrombosis was significantly inhibited by natrahagin in a dose-dependent manner, with inhibitory rate of 45.4% at the dose of 0.1 mg·kg<sup>-1</sup>. These results suggested that the inhibitory effect of natrahagin on artery thrombosis is related to its effect on inhibition of fibrinogen-mediated platelet aggregation and reduction of plasma fibrinogen level.

**Key words:** venom; proteinase; fibrinogen; platelet aggregation

( 本文编辑 乔虹 )