

闫泉香, 冯利, 徐峰, 等. 纳豆激酶的溶栓作用及其机制研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 340-346. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030178

YAN Quanxiang, FENG Li, XU Feng, et al. Thrombolytic Effect of Nattokinase and Its Mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 340-346. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030178

# 纳豆激酶的溶栓作用及其机制研究

闫泉香<sup>1</sup>, 冯利<sup>2</sup>, 徐峰<sup>3</sup>, 吴浩<sup>3,\*</sup>

(1. 沈阳开放大学理工学院, 辽宁沈阳 110003;

2. 国家开放大学医药学院, 北京 100039;

3. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 辽宁沈阳 110016)

**摘要:**目的: 研究纳豆激酶(nattokinase, NK)的体外和体内溶栓作用及其机制。方法: 采用血栓溶解法研究NK对陈旧血栓的体外溶解能力, 三氯化铁诱导的大鼠颈动脉血栓模型、下腔静脉结扎诱导的大鼠静脉血栓模型研究NK的体内溶栓作用; 通过检测血栓素(thromboxane, TXB<sub>2</sub>)、6-酮-前列腺素F<sub>1α</sub>(6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub>, 6-K-PGF<sub>1α</sub>)、前列腺素E<sub>2</sub>(Prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)、组织纤溶原激活剂(tissue type plasminogen activator, t-PA)、超氧阴离子自由基(·O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、羟自由基(·OH)、黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XOD)等指标来探究NK的溶栓作用机制。结果: 纳豆激酶在体外可以显著( $P<0.05$ )溶解陈旧血栓, 在体内表现出强大溶解动、静脉血栓作用, 且其溶栓作用比尿激酶强。纳豆激酶可显著( $P<0.05$ )影响TXB<sub>2</sub>、6-K-PGF<sub>1α</sub>、PGE<sub>2</sub>、t-PA、·O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH、XOD的水平, 表现为TXB<sub>2</sub>、PEG<sub>2</sub>、·O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH、XOD水平显著( $P<0.05$ )升高, 6-K-PGF<sub>1α</sub>、t-PA水平显著显著( $P<0.05$ )降低。结论: NK在体内外均表现出强大溶栓活性, 对新鲜血栓及陈旧血栓均有作用。NK可通过抑制血小板聚集, 减轻氧化损伤, 降低凝血因子水平而抑制血栓形成。NK也可通过刺激t-PA产生, 溶解纤维蛋白, 发挥直接溶栓作用以及可能通过抑制纤溶酶原激活物抑制因子1(Plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)产生而发挥间接溶栓作用。

**关键词:** 纳豆激酶, 溶栓作用, 氧化应激, 血小板聚集, 凝血因子

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)24-0340-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030178



本文网刊:

## Thrombolytic Effect of Nattokinase and Its Mechanism

YAN Quanxiang<sup>1</sup>, FENG Li<sup>2</sup>, XU Feng<sup>3</sup>, WU Hao<sup>3,\*</sup>

(1. College of Science and Technology, Shenyang Open University, Shenyang 110003, China;

2. College of Medicine, The Open University of China, Beijing 100039, China;

3. College of Life Sciences and Biological Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** Objective: Exploring the anti-thrombotic effect and mechanism of nattokinase(NK) *in vitro* and *vivo*. Methods: The thrombolytic effect of NK on old thrombus was studied by blood clot lysis method *in vitro*, the rat carotid artery thrombosis model induced by ferric chloride and the rat venous thrombosis model induced by inferior vena cava ligation method were used to study the thrombolytic effect of NK *in vivo*. Thromboxane(TXB<sub>2</sub>), 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub>(6-K-PGF<sub>1α</sub>), prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), tissue type plasminogen activator(t-PA), ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ·OH, xanthine oxidase(XOD) and other indicators were detected to explore the antithrombotic mechanism of NK. Results: Nattokinase could significantly dissolve old thrombus ( $P<0.05$ ) *in vitro*, and had a strong thrombolytic effect *in vivo*, and its thrombolytic effect was stronger than that of urokinase. Nattokinase could significantly affect the values of TXB<sub>2</sub>, 6-K-PGF<sub>1α</sub>, PGE<sub>2</sub>, t-PA, ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ·OH and XOD. The values of TXB<sub>2</sub>, PEG<sub>2</sub>, ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ·OH and XOD increased significantly( $P<0.05$ ), while the values of 6-K-PGF<sub>1α</sub> and t-PA decreased significantly( $P<0.05$ ). Conclusion: NK had strong thrombolytic activity *in vivo* and *in vitro*, and had effect on fresh thrombus and old thrombus. NK could inhibit thrombosis by inhibiting platelet aggregation, reducing oxidative damage and reducing the level of coagulation factors. NK could also play a direct thrombolytic role by stimulating the production of t-PA, dissolving fibrin, and might play an indirect thrombolytic role by inhibiting the production of plasminogen activator inhibitor 1(PAI-1).

收稿日期: 2021-03-15

作者简介: 闫泉香(1970-),女,硕士,副教授,研究方向:心血管药理学、远程药理学教育方面的研究,E-mail: 1332012357@qq.com。

\* 通信作者: 吴浩(1986-),男,博士,讲师,研究方向:心血管药理学方面的研究,E-mail: 290045687@qq.com。

**Key words:** nattokinase; thrombolysis; oxidative damage; platelet aggregation; coagulation factors

血栓性疾病严重威胁人类的生命健康,是当代医学研究的重点和热点之一<sup>[1]</sup>。据统计<sup>[2]</sup>,因血栓导致的死亡人数占全球死亡总人数的 1/3~1/2。随着我国居民生活水平的持续提高,其生活方式和饮食习惯也发生了巨大变化,血栓相关性疾病的发病率和死亡率也不断攀升。在过去的 30 多年里,我国心脑血管疾病的发病率和死亡率迅猛增长<sup>[3-4]</sup>,我国心脑血管疾病的总死亡率远高于高收入和中等收入国家,是邻国日本的 3 倍多。因此,积极预防和治疗血栓疾病是我国健康事业的当务之急。

目前,临床上使用的抗血栓药物主要有抗凝血药、抗血小板聚集药和溶栓药三类<sup>[5]</sup>。虽然可供选择的抗血栓药物较多,但其不能溶解陈旧血栓,且直接作用弱,有出血、过敏反应等不良反应<sup>[6]</sup>。日本学者从纳豆中发现的纳豆激酶是一种具有强效溶栓作用的丝氨酸蛋白酶<sup>[7]</sup>。纳豆激酶源自我国的传统食物,具有安全性高、分子量小、可被肠道吸收、起效快、溶栓效果持续时间长,且可溶解陈旧血栓等优点<sup>[8-9]</sup>,有望开发成为具有市场潜力的抗血栓药物。目前对纳豆激酶的研究大多停留在发酵条件优化<sup>[10]</sup>、分离纯化<sup>[11]</sup>、药效学<sup>[12]</sup>等层面,缺乏对其抗血栓作用及其机制的深入研究。

本文采用体外和体内试验相结合的方法,研究了纳豆激酶对陈旧血栓、静脉和动脉血栓的溶栓作用,并进一步从抑制血栓形成和溶解血栓两方面研究了纳豆激酶抗血栓作用的可能的分子机制。深入研究纳豆激酶的抗血栓作用及其机制,为纳豆激酶开发成为新型抗血栓药物提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

SPF 级雄性 SD 大鼠 150 只,2~3 月龄,辽宁长生生物技术有限公司(动物合格证号: SCXK2010-0001),大鼠饲养于温度为 24±1 °C,相对湿度为 50%~60%,12 h 光照(08:00~20:00),12 h 黑暗,隔音的 SPF 级动物房内,大鼠自由摄食、饮水;纳豆激酶(20000 FU/g) 广东双骏生物科技有限公司(生产批号: 120306130518140110);三氯化铁(分析纯) 天津大茂化学试剂厂;水合氯醛(10% w/v) 中国医药集团上海化学试剂公司。

STAT FAX 2100 全自动酶免仪 美国阿尼朗斯公司; VARIOSKAN FLASH 多功能酶标仪 北京博仪恒业科技发展有限公司; BI-2000 微循环观测系统 成都泰盟科技有限公司; 迈瑞 BC-2900 型全自动血细胞分析仪 深圳迈瑞医疗公司; MVIS-2015 型全自动血液流变分析仪 重庆天海医疗设备有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 纳豆激酶对陈旧血栓的体外溶解实验 取

9 只大鼠,每只大鼠尾静脉取血 1.5 mL,置于 2 mL EP 管中于 4 °C 静置,1 d 后,待血液凝固成胶冻状,切割成均匀大小血栓(约 125 mm<sup>3</sup>),用生理盐水冲洗血块表面,称重,置于试管中,立即分别加入 1 mL 不同剂量(20、50、100、500、1000、2000 FU/kg)的 NK 溶液、不同剂量(1000、10000 FU/kg)的尿激酶(Urokinase, UK)溶液(阳性对照药)和生理盐水(空白对照),于 37 °C 恒温箱中密封静置,分别于 0.5、2、4、8、16、24、36、48 h,取出血块,用滤纸吸净表面水分,称重<sup>[13]</sup>。

#### 1.2.2 纳豆激酶对三氯化铁诱导的大鼠颈动脉血栓的作用

将 80 只大鼠分为假手术组(注射生理盐水)、模型组(注射生理盐水)、五个 NK 剂量组(125、250、500、1000、2000 FU/kg)及 UK 组(10000 IU/kg)(预实验结果显示,在体内 1000 IU/kg 尿激酶完全无效,不能作为阳性药,10000 IU/kg,能出阳性结果,所以选择该剂量),每组 10 只,一次给药后(尾静脉注射),用 10% 水合氯醛麻醉(0.3 mL/100 g),备皮,分离两侧颈动脉,左侧分离约 2 cm,其下置小片塑料薄膜,用于保护血管周围组织,用含 35% 三氯化铁 20 μL(假手术组使用等量的生理盐水)的小片定量滤纸(1 cm×1 cm)敷于其上,右侧颈总动脉埋线待用,30 min 后去除滤纸片,去除滤纸片 1.5 h 后,于右侧颈总动脉插管取血,置于肝素浸润的 EP 管中,4 °C 3000 r/min 离心 15 min,取上层血浆,用于血液指标测定。结扎左侧颈动脉并取出血栓,用滤纸片吸干并称重。

#### 1.2.3 纳豆激酶对大鼠下腔静脉结扎血栓形成的影响

将大鼠称重并分为 6 组,每组 10 只,尾静脉注射给予纳豆激酶高(2000 FU/kg)、中(1000 FU/kg)、低(500 FU/kg)剂量,模型组和假手术组给与等量的生理盐水,阳性对照组给与尿激酶(10000 IU/kg)。给药 1 h 后,腹腔注射 3.5% 水合氯醛溶液(1 mL/100 g)麻醉大鼠。将麻醉后的大鼠仰卧固定,于腹正中线切开皮肤约 1.5 cm,从腹白线切开腹膜,分离下腔静脉,于左肾静脉下方用粗丝线完全结扎下腔静脉(假手术组不结扎),缝合腹膜。4 h 后重新打开腹腔,在结扎线下方 2 cm 处用止血钳夹住血管,剪断取出该段血管,检查是否有血栓形成,若形成,则将血栓取出,用滤纸轻轻擦干后称重。

#### 1.2.4 大鼠血清血液指标测定

将 100 只大鼠分为正常对照组(注射生理盐水)、模型组(注射生理盐水)、7 个 NK 剂量组(67.5、100、125、250、500、1000、2000 FU/kg)及 UK 10000 IU/kg 组。每组 10 只,一次给药后(尾静脉注射),用 10% 水合氯醛麻醉(0.3 mL/100 g),备皮,分离两侧颈动脉,左侧分离约 2 cm,其下置小片塑料薄膜,用于保护血管周围组织,

表 1 纳豆激酶对 1 d 大鼠血栓的影响(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )  
Table 1 Effect of NK on 1 d old thrombus of rat *in vitro*(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

组别	剂量 (NK, FU/kg; UK, IU/kg)	血栓重量(mg)								
		0 h	0.5 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h
NaCl	-	213.81±3.33	210.51±4.82	205.42±3.71	202.40±1.90	192.41±0.80	191.70±1.12	186.31±2.50	176.40±2.20	174.01±2.61
NK	20	252.91±1.62	214.61±2.32	193.82±2.21	153.11±2.50	123.50±1.71	79.12±6.23	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
NK	50	251.52±1.70	193.30±1.71	103.40±4.41	23.91±2.01	22.50±2.80	12.81±1.82	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
NK	100	254.91±3.92	222.21±1.70	213.01±2.62	175.32±2.71	14.32±2.41	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
NK	500	255.42±1.50	196.22±1.90	92.62±3.93	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
NK	1000	249.01±1.71	166.81±6.82	22.42±2.41	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
NK	2000	257.62±3.30	124.33±1.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
UK	1000	252.83±3.81	213.81±1.62	193.90±3.11	153.60±1.60	133.01±1.71	92.50±1.21	13.90±2.20	3.71±1.72	0.00±0.00
UK	10000	241.83±1.92	232.01±2.33	223.02±2.80	203.11±3.71	173.21±1.81	142.41±0.82	93.21±2.50	40.62±1.70	0.00±0.00

用含 35% 三氯化铁 20 μL(假手术组使用等量的生理盐水)的小片定量滤纸(1 cm×1 cm)敷于其上,右侧颈总动脉埋线待用,30 min 后去除滤纸片,去除滤纸片 1.5 h 后,于右侧颈总动脉插管取血,置于肝素浸润的 EP 管中,4 ℃ 3000 r/min 离心 15 min,取血,采用放射免疫法按照试剂盒说明书中的操作步骤和试剂剂量测定大鼠血浆中的血栓素 B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>),6-酮前列腺素 F<sub>1α</sub>(6-K-PGF<sub>1α</sub>)、前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)、羟自由基(·OH)、LF(脂褐素)、超氧阴离子(·O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、黄嘌呤氧化酶(XOD)水平、组织纤溶酶原激活物(t-PA)。

### 1.3 数据处理

实验数据采用 SPSS 软件(11.0 版)进行统计。各组数据均用( $\bar{x}\pm SD$ )表示,实验采用 One-Way ANOVA 进行数据处理。使用 LSD 进行组间两两比较(当方差齐时),使用 Dunnett's T3 进行组间两两比较(当方差不齐时)。

## 2 结果与分析

### 2.1 纳豆激酶对陈旧血栓的体外溶解实验

纳豆激酶对陈旧血栓的体外溶解实验结果见表 1。由表 1 可见,0~4 h 内,NK 100 FU/kg 的溶栓作用和 UK 10000 IU/kg 几乎相当,大于 UK 1000 IU/kg 的溶解速率;在 8 h 时后,NK100 FU/kg 对血栓的溶解作用明显强于 UK 1000 IU/kg。给与 NK 2000 FU/kg,2 h 后,血栓完全溶解;给与 100 FU/kg NK 12 h 后血栓完全溶解;给与 UK,需要 48 h 才能将血栓完全溶解。生理盐水对血栓作用不明显,血栓在 48 h 后仍没完全溶解,由于血栓的自然收缩,析出血清,血栓重量也有所降低。因此,NK 对体外大鼠陈旧血栓的溶解作用与 NK 的剂量及作用时间成正比,NK 剂量越大、作用时间越长,溶解效果越好,且 NK 的溶栓效果远好于同等剂量的 UK。

### 2.2 纳豆激酶对动脉血栓形成的作用

纳豆激酶对动脉血栓作用的试验结果见表 2。由表 2 可见,与模型组相比,假手术组未形成明显血栓。NK 在 125 FU/kg 剂量时没有明显溶栓效果,从 250 FU/kg 剂量开始起效,剂量达到 2000 FU/kg 时,血栓溶解超过一半,且溶栓效果与剂量成正比,剂

表 2 静脉注射 NK 对三氯化铁诱导的大鼠颈动脉血栓的作用(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

Table 2 Effect of NK injected on carotid arterial thrombosis induced by FeCl<sub>3</sub> in rats(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

组别	剂量(NK, FU/kg; UK, IU/kg)	血栓重量(mg)
假手术组	-	0.00±0.00
模型组	-	4.91±0.62 <sup>##</sup>
NK	125	5.01±0.31
NK	250	4.42±0.31*
NK	500	3.62±0.11**
NK	1000	3.01±0.22**
NK	2000	2.31±0.42**
UK	10000	4.31±0.54*

注: <sup>##</sup>P<0.01,与空白对照组相比; \*P<0.05, \*\*P<0.01,与模型组相比; NK: 纳豆激酶; UK: 尿激酶; 表3~表6同。

量越大,溶栓效果越好。因此,纳豆激酶 250 FU/kg 可显著(P<0.05)降低三氯化铁诱导的大鼠颈动脉血栓重量,明显抑制血栓形成,且 NK 500 FU/kg 抗血栓作用的效果优于 UK 10000 IU/kg。

### 2.3 纳豆激酶对静脉血栓形成的作用

纳豆激酶对静脉血栓作用的试验结果见表 3。由表 3 可见,与模型组相比,假手术组未形成明显血栓。给予 NK 500 FU/kg 后开始起效,且效果强于 10000 IU/kg 的 UK;低、中、高三个剂量的 NK 均可极显著(P<0.01)降低结扎法诱导的大鼠下腔静脉血栓重量,剂量达到 2000 FU/kg 时,血栓重量比模型组减少约 73%。因此,纳豆激酶可明显抑制下腔静脉血栓的形成,且抗血栓效果优于尿激酶。

综上,纳豆激酶在体内对动、静脉血栓的形成均

表 3 静脉注射 NK 对腹静脉结扎导致血栓的作用(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

Table 3 Effect of NK on abdominal vein thrombosis induced by ligation in rats(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

组别	剂量(NK, FU/kg; UK, IU/kg)	血栓重量(mg)
假手术组	-	0.00±0.00
模型组	-	11.51±5.30 <sup>##</sup>
NK	500	5.62±3.31**
NK	1000	5.62±3.41**
NK	2000	3.10±1.71**
UK	10000	7.71±1.82*

具有良好的对抗作用,且其作用效果优于传统抗血栓药物尿激酶。

### 2.4 纳豆激酶对大鼠血清血液指标的影响

2.4.1 纳豆激酶对血小板聚集的影响 TXB<sub>2</sub>、6-K-PGF1 $\alpha$  和 PGE<sub>2</sub> 是参与血小板聚集和炎症反应的重要因子<sup>[14-15]</sup>。纳豆激酶对血小板聚集影响的试验结果如表 4 所示。

由表 4 可见,与空白对照组相比,模型组大鼠血浆中的 TXB<sub>2</sub> 及 PGE<sub>2</sub> 水平明显升高,6-K-PGF1 $\alpha$  水平明显降低,说明建模成功。与模型组大鼠相比,纳豆激酶 500 和 67.5 FU/kg 可分别极显著( $P<0.01$ )降低大鼠血浆中的 PGE<sub>2</sub> 和 TXB<sub>2</sub> 的水平,纳豆激酶在 100~500 FU/kg 范围内,可显著( $P<0.05$ )升高大鼠血浆中的 6-K-PGF1 $\alpha$  水平,并呈剂量依赖性。10000 FU/kg 的尿激酶对模型组大鼠血浆中升高的 PGE<sub>2</sub> 及 TXB<sub>2</sub> 水平无明显效果。

2.4.2 纳豆激酶对氧化损伤的影响 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH、LF 及 XOD 是参与氧化应激的重要因子。纳豆激酶对大鼠血液中的氧化应激指标影响的试验结果如表 5 所示。

结果显示,与空白对照组相比,模型组大鼠血浆中的·O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH、LF 和 XOD 水平均明显升高。与模型组相比,纳豆激酶 125 FU/kg 可显著降低·O<sub>2</sub><sup>-</sup>和·OH 的水平( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),纳豆激酶 67.5 FU/kg

可极显著降低 LF 及 XOD 的水平( $P<0.01$ )。UK 10000 IU/kg 对·O<sub>2</sub><sup>-</sup>和·OH 水平的影响不显著( $P>0.05$ )。

2.4.3 纳豆激酶对 t-PA 的影响 组织型纤溶酶原激活物(t-PA)可激活纤溶酶原转化为纤溶酶。纳豆激酶对大鼠血浆中的 t-PA 水平影响的试验结果如表 6 所示。

由表 6 可见,与空白对照组相比,模型组大鼠血浆中的 t-PA 的含量极显著( $P<0.01$ )降低;与模型组相比,纳豆激酶所有给药组的 t-PA 水平均有所升高,纳豆激酶的较低剂量组(125 FU/kg)即表现出显著性( $P<0.05$ )地升高 t-PA 水平效应,效果与阳性药尿激酶相仿。因此,纳豆激酶可明显增加 t-PA 含量,直接激活纤溶酶原,发挥间接溶栓作用。

## 3 讨论

### 3.1 纳豆激酶抑制血栓形成的机制

3.1.1 抑制血小板的聚集 血小板聚集是凝血的起始步骤,而集聚状态的血小板是血栓的主要组成部分之一<sup>[16]</sup>。血栓素(TXB<sub>2</sub>)是引发血小板聚集,促进血栓形成的重要物质;生理剂量的前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)也可以促进血小板聚集;而 6-酮-前列腺素(6-K-PGF1 $\alpha$ )可以抑制血小板的聚集。在本研究中,纳豆激酶可以降低模型组动物血浆中升高的 TXB<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> 的水平,提升 6-K-PGF1 $\alpha$  水平从而阻止血小板聚集,抑制血栓的形成。因此,纳豆激酶可使炎症反应代谢途径发

表 4 纳豆激酶对大鼠血浆 TXB<sub>2</sub>、6-K-PGF1 $\alpha$  和 PGE<sub>2</sub> 水平的影响(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

Table 4 Effect of NK on the level of TXB<sub>2</sub>、6-K-PGF1 $\alpha$ , and PGE<sub>2</sub>(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

组别	剂量 (NK, FU/kg; UK, IU/kg)	6-K-PGF1 $\alpha$ (pg/mL)	PGE <sub>2</sub> (pg/mL)	TXB <sub>2</sub> (pg/mL)
空白对照组	-	73.32 $\pm$ 14.53	20.54 $\pm$ 4.55	91.29 $\pm$ 25.97
模型组	-	66.64 $\pm$ 14.69 <sup>##</sup>	27.61 $\pm$ 3.81 <sup>##</sup>	131.11 $\pm$ 15.19 <sup>##</sup>
NK	67.5	-	-	71.29 $\pm$ 4.64 <sup>**</sup>
NK	100	74.00 $\pm$ 15.20 <sup>**</sup>	-	-
NK	125	87.09 $\pm$ 15.27 <sup>*</sup>	-	75.62 $\pm$ 5.06 <sup>*</sup>
NK	250	95.27 $\pm$ 27.64 <sup>*</sup>	-	71.10 $\pm$ 12.48 <sup>**</sup>
NK	500	109.92 $\pm$ 34.57 <sup>*</sup>	18.18 $\pm$ 3.40 <sup>**</sup>	78.67 $\pm$ 7.66 <sup>*</sup>
NK	1000	-	18.68 $\pm$ 3.62 <sup>**</sup>	76.94 $\pm$ 14.44 <sup>*</sup>
NK	2000	-	18.42 $\pm$ 1.79 <sup>**</sup>	77.72 $\pm$ 4.86 <sup>*</sup>
UK	10000	125.74 $\pm$ 8.05 <sup>**</sup>	32.10 $\pm$ 4.10	132.16 $\pm$ 36.94

表 5 纳豆激酶对大鼠血液中的·O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH 及 LF 水平的影响(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

Table 5 Effect of NK on the level of ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH, LF, and XOD(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

组别	剂量 (NK, FU/kg; UK, IU/kg)	·O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (U/mL)	·OH (U/mL)	LF ( $\mu$ g/mL)	XOD (U/mL)
空白对照组	-	131.31 $\pm$ 10.67	453.65 $\pm$ 305.31	7.50 $\pm$ 2.79	4.14 $\pm$ 0.19
模型组	-	179.73 $\pm$ 21.98 <sup>##</sup>	603.26 $\pm$ 228.48 <sup>##</sup>	16.64 $\pm$ 2.82 <sup>##</sup>	5.78 $\pm$ 1.02 <sup>##</sup>
NK	67.5	168.79 $\pm$ 19.11	654.73 $\pm$ 327.55	5.21 $\pm$ 1.30 <sup>**</sup>	4.63 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup>
NK	125	162.24 $\pm$ 7.32 <sup>*</sup>	737.23 $\pm$ 161.97 <sup>**</sup>	5.52 $\pm$ 0.81 <sup>**</sup>	4.55 $\pm$ 1.04 <sup>**</sup>
NK	250	157.93 $\pm$ 15.12 <sup>*</sup>	762.26 $\pm$ 213.13 <sup>**</sup>	5.43 $\pm$ 0.57 <sup>**</sup>	4.10 $\pm$ 0.46 <sup>**</sup>
NK	500	153.11 $\pm$ 26.44 <sup>*</sup>	774.64 $\pm$ 199.28 <sup>**</sup>	6.38 $\pm$ 1.21 <sup>**</sup>	3.98 $\pm$ 0.65 <sup>**</sup>
NK	1000	151.91 $\pm$ 13.71 <sup>**</sup>	791.79 $\pm$ 102.81 <sup>**</sup>	6.92 $\pm$ 0.31 <sup>**</sup>	3.72 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup>
NK	2000	12.13 $\pm$ 12.71 <sup>**</sup>	858.66 $\pm$ 82.29 <sup>**</sup>	5.76 $\pm$ 0.51 <sup>**</sup>	3.52 $\pm$ 0.26 <sup>**</sup>
UK	10000	163.95 $\pm$ 16.10	496.50 $\pm$ 165.09	5.08 $\pm$ 2.86 <sup>**</sup>	4.85 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup>

表 6 纳豆激酶对大鼠血浆中 t-PA 水平的影响 (n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

Table 6 Effect of NK on the level of t-PA(n=10,  $\bar{x}\pm SD$ )

组别	剂量 (NK, FU/kg; UK, IU/kg)	t-PA (ng/mL)
空白对照组	-	4.58±0.24
模型组	-	3.39±0.26 <sup>##</sup>
NK	100	5.00±0.59
NK	125	5.66±0.41 <sup>*</sup>
NK	250	5.75±1.06 <sup>*</sup>
NK	500	5.53±0.54 <sup>*</sup>
UK	10000	5.61±0.69 <sup>*</sup>

生偏转,花生四烯酸原来可以直接生成 TXB<sub>2</sub>,现在变为生成 6-K-PGF1 $\alpha$ ,从而使 TXB<sub>2</sub>生成减少。这与文献 [17] 的报道是一致的。

3.1.2 纳豆激酶对炎症代谢途径的影响 本文首次发现,纳豆激酶可使炎症反应代谢途径发生偏转,由花生四烯酸直接生成 TXB<sub>2</sub>,改变成生成 6 酮前列腺素,而使 TXB<sub>2</sub>生成减少(详见图 1),这与经典的非甾体抗炎药完全不同。

3.1.3 降低氧化损伤 血管内皮氧化损伤是血栓形成的重要原因之一<sup>[18]</sup>,损伤的血管内皮细胞暴露出胶原蛋白,激活血小板,启动凝血系统。自由基与活性氧是重要的生物活性物质,具有很强的氧化性,是造成组织细胞损伤的元凶<sup>[19]</sup>。血管中存在氧化与抗氧化两种系统,当血管中氧化程度超出细胞对氧化物的清除能力,氧化系统和抗氧化系统失衡,就会导致血管内皮损伤,逐渐形成血栓<sup>[20-21]</sup>。脂褐素(LF)是老年斑的主要成分,可沉积在血管壁导致血管损伤,血栓形成,动脉粥样硬化等疾病<sup>[22]</sup>。黄嘌呤氧化酶(XOD)可催化自由基的产生,从而造成血管损伤,血

栓形成<sup>[23]</sup>。在本研究中,纳豆激酶可以降低·O<sub>2</sub>、·OH、LF、XOD 的水平,从而减轻氧化损伤和过氧化物堆积,抑制血栓的形成,对治疗动脉粥样氧化等疾病具有潜在应用价值<sup>[24-25]</sup>。

### 3.2 纳豆激酶溶解血栓的机制

3.2.1 直接溶栓 纤维蛋白是血栓的主要成分之一<sup>[26]</sup>,纤维蛋白单体由纤维蛋白原激活产生。随后,纤维蛋白单体聚集并与血小板一起形成血栓。已有实验通过纤维蛋白平板法,发现纳豆激酶可在加热和未加热的纤维蛋白平板上产生溶解圈,证明了纳豆激酶可直接溶解纤维蛋白<sup>[27]</sup>。在本研究的预实验中,也得出类似结果,且纳豆激酶对纤维蛋白的溶解作用大于尿激酶。此外,在体内,纳豆激酶也可以发挥纤溶作用<sup>[28-29]</sup>。

3.2.2 间接溶栓 纤溶酶为体内溶解血栓的重要物质,可将不溶性的纤维蛋白降解为可溶性的产物。组织型纤溶酶原激活物(t-PA)在体内纤溶系统调控中起重要作用<sup>[30]</sup>,其可激活纤溶酶原生成纤溶酶而溶解血栓。与文献 [31] 报道一致,在本研究中,纳豆激酶可刺激血管内皮细胞产生 t-PA,增加机体内 t-PA 的含量,从而发挥间接溶栓作用。

纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)也是体内调控纤溶系统的重要物质,PAI-1 可抑制 t-PA 从而抑制纤溶酶原的激活<sup>[32]</sup>。有研究<sup>[33-35]</sup>表明纳豆激酶可降低 PAI-1 活性,促进 t-PA 激活纤溶酶原,产生纤溶酶,溶解血栓。

## 4 结论

本研究显示,纳豆激酶具有良好的体内外溶栓作用,对陈旧血栓、静脉、动脉血栓均有良好的溶栓效果。纳豆激酶的溶栓机制可能与其抑制血小板聚

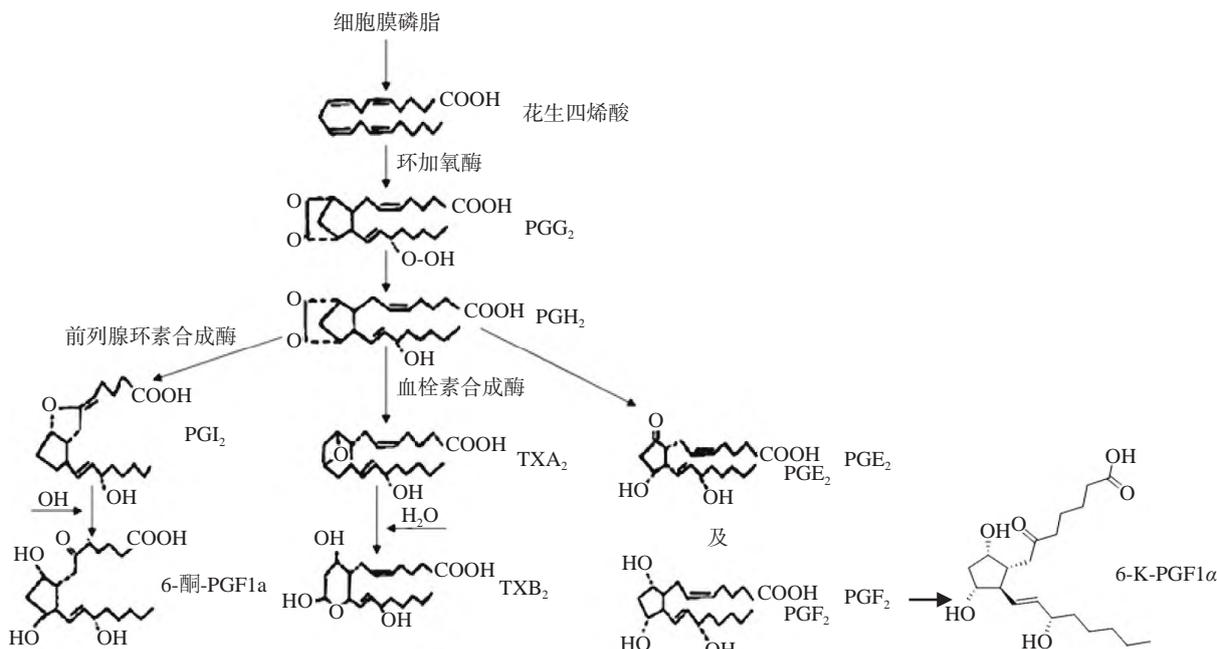


图 1 NK 的抗炎机制

Fig.1 Anti-inflammatory mechanism of NK

集,减轻氧化损伤而抑制血栓形成有关。还可能与其可以通过提高 t-PA 的水平或抑制 PAI-1 而间接发挥溶栓作用有关。

### 参考文献

- [1] WANG Y, GAO H, C W KESSINGER, et al. Myeloid-related protein-14 regulates deep vein thrombosis[J]. *Jci Insight*, 2017, 2(11): 1-12.
- [2] 刘泽霖, 贺石林, 李家增. 血栓性疾病的诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 115-116. [LIU Z L, HE S L, LI J Z. Diagnosis and treatment of thrombotic diseases[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 115-116.]
- [3] WANG W, JIANG B, SUN H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China[J]. *Circulation*, 2017, 35(13): 759-771.
- [4] WU Y, BENJAMIN E J, MACMAHON S. Prevention and control of cardiovascular disease in the rapidly changing economy of China[J]. *Circulation*, 2016, 133(24): 2545-2560.
- [5] 王春霞. 抗血栓药物研究进展[J]. 当代临床医刊, 2012, 25(5): 86-88. [WANG C X. Research progress of antithrombotic drugs[J]. *The Medical Journal of Industrial Enterprise*, 2012, 25(5): 86-88.]
- [6] VAN GIJN J, ALGRA A. Secondary stroke prevention with antithrombotic drugs[J]. *Current Vascular Pharmacology*, 2010, 7(Suppl.6): 30-32.
- [7] 陈志文, 徐尔尼, 肖美燕. 纳豆激酶的研究进展[J]. 食品科学, 2002, 23(10): 130-134. [CHEN Z W, XU E N, XIAO M Y. Research progress of nattokinase[J]. *Food Science*, 2002, 23(10): 130-134.]
- [8] SUMI H, HAMADA H, NAKANISHI K, et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase[J]. *Acta Haematologica*, 1990, 84(3): 139-143.
- [9] YASUHIDE, YANAGISAWA, TOSHIYUKI, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiment of nattokinase from *Bacillus subtilis* natto[J]. *Acta Crystallographica*, 2010, F66: 1670-1673.
- [10] 胡升, 梅乐和, 姚善涇. 响应面法优化纳豆激酶液体发酵[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(1): 13-17. [HU S, MEI L H, YAO S J. Optimization of submerged fermentation of nattokinase production by *Bacillus subtilis* with response surface methodology[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2003, 29(1): 13-17.]
- [11] 朱健辉, 杜连祥, 路福平, 等. 高效溶栓酶-纳豆激酶的纯化及酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2006(1): 68-71. [ZHU J H, DU L X, LU F P, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme-nattokinase[J]. *Microbiology China*, 2006(1): 68-71.]
- [12] 王俊菊, 李培锋, 关红. 纳豆激酶抗凝血作用的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(5): 276-278. [WANG J J, LI P F, GUAN H. Anticoagulant effects of nattokinase in rats[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2004, 25(5): 276-278.]
- [13] 周伏忠, 贾蕴莉, 陈国参, 等. 纳豆激酶体外溶栓效果的初步观察[J]. 食品科技, 2008, 33(6): 249-253. [ZHOU F Z, JIA Y L, CHEN G S, et al. A preliminary study of nattokinase thrombolysis effect *in vitro*[J]. *Food Science and Technology*, 2008, 33(6):

249-253.]

- [14] 吴少琴, 季乃军, 蓝翔. 永久性心房颤动患者血清 TXB<sub>2</sub>、6-K-PGF<sub>1α</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 改变的探讨[J]. 放射免疫学杂志, 2013, 26(5): 549-551. [WU S Q, JI N J, LAN X. Exploration the change of thromboxane B<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> in permanent atrial fibrillation patients[J]. *Journal of Radioimmunology*, 2013, 26(5): 549-551.]
- [15] 宋秀凤. 银屑病和湿疹患者体内花生四烯酸代谢产物水平检测[D]. 济南: 山东大学, 2011. [SONG X F. A study of arachidonic acid metabolites in psoriasis and eczema[D]. Jinan: Shandong University, 2011.]
- [16] HUBBARD G P, S WOLFFRAM, J A LOVEGROVE, et al. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans[J]. *Journal of Thrombosis & Haemostasis*, 2010, 2(12): 2138-2145.
- [17] KUROSAWA Y, NIRENGI S, HOMMA T, et al. A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anticoagulation profiles[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11601.
- [18] 张润玲, 刘玉梅, 潘云燕, 等. 脑血栓前期血管内皮细胞损伤研究[J]. 国际检验医学杂志, 2005, 26(7): 1-3. [ZHANG R L, LIU Y M, PAN Y Y, et al. A study on the damage of endotheliocyte in prethrombotic state with brain[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2005, 26(7): 1-3.]
- [19] 顾炜, 马贤德, 全连峰, 等. 特丁基对苯二酚抑制中波紫外线诱发 HaCaT 细胞氧化损伤[J]. 中国医科大学学报, 2016(4): 337-339. [GU W, MA X D, QUAN L F, et al. Tert-butylhydroquinone protects HaCaT cells from ultraviolet B-induced oxidative damages[J]. *Journal of China Medical University*, 2016(4): 337-339.]
- [20] 甘晓, 应燕萍. 氧化应激与血栓性疾病关系的研究进展[J]. 临床心血管病杂志, 2019, 35(8): 758-762. [GAN X, YING Y P. Research progress in the relationship between oxidative stress and thrombotic diseases[J]. *Journal of Clinical Cardiology*, 2019, 35(8): 758-762.]
- [21] 张洁. 氧化应激在高原动脉粥样硬化发生发展中的作用机制[J]. 中国民族医药杂志, 2016, 22(9): 64-67. [ZHANG J. Mechanism of oxidative stress in the occurrence and development of atherosclerosis at high altitude[J]. *Journal of Medicine and Pharmacy of Chinese Minorities*, 2016, 22(9): 64-67.]
- [22] 李德卫, 赵渝, 时德, 等. 下肢血栓闭塞性脉管炎患者腰交感神经节的病理变化[J]. 医学争鸣, 2003, 24(24): 2251-2254. [LI D W, ZHAO Y, SHI D, et al. Pathological changes of lumbar sympathetic ganglia in patients with lower extremity thromboangiitis obliterans[J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2003, 24(24): 2251-2254.]
- [23] 李延广. 阵发性心房颤动对内皮功能的影响研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(12): 1253-1256. [LI Y G. Effect of paroxysmal atrial fibrillation on endothelial function[J]. *Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases*, 2015, 17(12): 1253-1256.]
- [24] IWAI K, NAKAYA N, KAWASAKI Y, et al. Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: Effect on LDL

- oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2002, 50(12): 3597-3601.
- [25] CHANG C H, CHEN K T, LEE T H, et al. Effects of natto extract on endothelial injury in a rat model[J]. *Acta Medica Okayama*, 2010, 64(6): 399-406.
- [26] 李健. 纤维蛋白相关标志物在诊断和预防中的联合应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(3): 233-235. [LI J. Combined application of fibrin related markers in diagnosis and prevention[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2014, 37(3): 233-235.]
- [27] XU J, DU M, YANG X, et al. Thrombolytic effects *in vivo* of nattokinase in a carrageenan-induced rat model of thrombosis[J]. *Acta Haematologica*, 2014, 132(2): 247-253.
- [28] SUMI, 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.
- [29] FUJITA M, HONG K, ITO Y, et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1995, 18(10): 1387-1391.
- [30] 于淑红, 邢美玲. t-PA 与血栓性疾病的相关性研究[J]. *中国误诊学杂志*, 2006, 6(12): 2322-2323. [YU S H, XING M L. Correlation between t-PA and thrombotic diseases[J]. *Chinese Journal of Misdiagnostics*, 2006, 6(12): 2322-2323.]
- [31] 陈丽娟, 沙长青, 任永春, 等. 纳豆激酶溶解血栓机制[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(4): 53-56, 61. [CHEN L J, SHA C-Q, REN Y C, et al. Advances in research on thrombolysis mechanism of nattokinase[J]. *China Biotechnology*, 2003, 23(4): 53-56, 61.]
- [32] 韩玮, 於四军, 罗建平, 等. 急性冠脉综合征患者血清 SCD40 L, Periostin, IMA, PAI-1 水平改变以及心功能的研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(14): 1377-1380. [HAN W, YU S J, LUO J P, et al. Changes of serum SCD40L, periostin, IMA, PAI-1 levels and cardiac function in patients with acute coronary syndrome[J]. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2016, 15(14): 1377-1380.]
- [33] AMIN K, ZENG X B, YING Y, et al. Effect of pulsed electric fields(PEF) on protease and antioxidant activity of selenium modified fibrinolytic enzyme nattokinase produced by *Bacillus natto* cells[J]. *International Journal of Biosciences*, 2019, 14(5): 282-293.
- [34] KATSUTANI M, ITO T, MASAKI T, et al. Glucose-based PD solution, but not icodextrin-based pd solution, induces plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2[J]. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 2007, 11(2): 94-100.
- [35] HASSANNEJAD S, RAZEGHIAN E, SHOJAEI N. Relationship between PAI1 promoter 4G/5g polymorphism and stroke[J]. *Personalized Medicine*, 2020, 5(17): 18-20.