

米曲溶纤维蛋白酶(3·951)对血液凝固及纤维蛋白(原)溶解作用的研究

生理学教研室 卢秀劲 姜乾金

米曲溶纤维蛋白酶是从米曲霉菌的培养液中提纯的蛋白酶,在试管内能直接溶解血块而不激活纤维蛋白溶解系统^(1,2)。Fitzgerald⁽³⁾等对一组慢性动脉梗阻的患者,反复应用米曲溶纤维蛋白酶治疗后,与对照组比较血流再通有显著改善。Lund⁽⁴⁾等用该蛋白酶治疗肢体动脉闭塞性疾病也证明有好转,而没有观察到并发出血。但Sawyer⁽⁵⁾在犬的实验中,发现长期用米曲溶纤维蛋白酶的亚致死量可干扰内源性凝血,发生血液凝固能力降低。

血栓性疾病的发生、发展,除血管壁病变和血流障碍外,还与血小板功能、凝血功能及纤维蛋白溶解活性的改变有关。前文⁽⁶⁾已证明我国近年通过紫外线诱变和长期驯化得到的米曲霉菌株(3·951),其提出液含米曲溶纤维蛋白酶,对纤维蛋白溶解力较强,注射于兔能使血栓溶解,副作用较少。我们进一步研究它在体外及在动物体内对血液凝固及血浆纤维蛋白(原)的溶解作用,希对该蛋白酶的性质有深入的认识,以供临床应用参考。

方 法

一、体外纤维蛋白溶解试验

1. 将米曲霉菌(3·951)培养液中的提出液(方法见前文⁽⁶⁾),经测定含米曲溶纤维蛋白酶500u/ml) 0.05ml滴于加热及未加热纤维蛋白平板上测量各单位时间的溶解面积。

2. 测定米曲溶纤维蛋白酶对血浆凝块的溶解时间

取含有纤维蛋白原(Fbg) 400mg%的血浆,用生理盐水按4/5、3/5、2/5倍数稀释成3种血浆,分别含有纤维蛋白原3.2、2.4、1.6mg/ml,分装于口径相同的3组小号试管,每组8管,每管盛0.5ml。

另取米曲溶纤维蛋白酶,

1. 将加热 (85℃) 纤维蛋白平板 (使纤维溶系统破坏) 及未加热纤维蛋白平板, 滴以米曲溶纤维蛋白酶 (3.951) 溶液, 进行观察, 发现其溶解面积随时间延长而扩大。测量其各单位时间的溶解面积, 经统计学处理, 两种平板无显著差异 ($P > 0.5$), 见图 1。但 24 小时后均不再扩大。

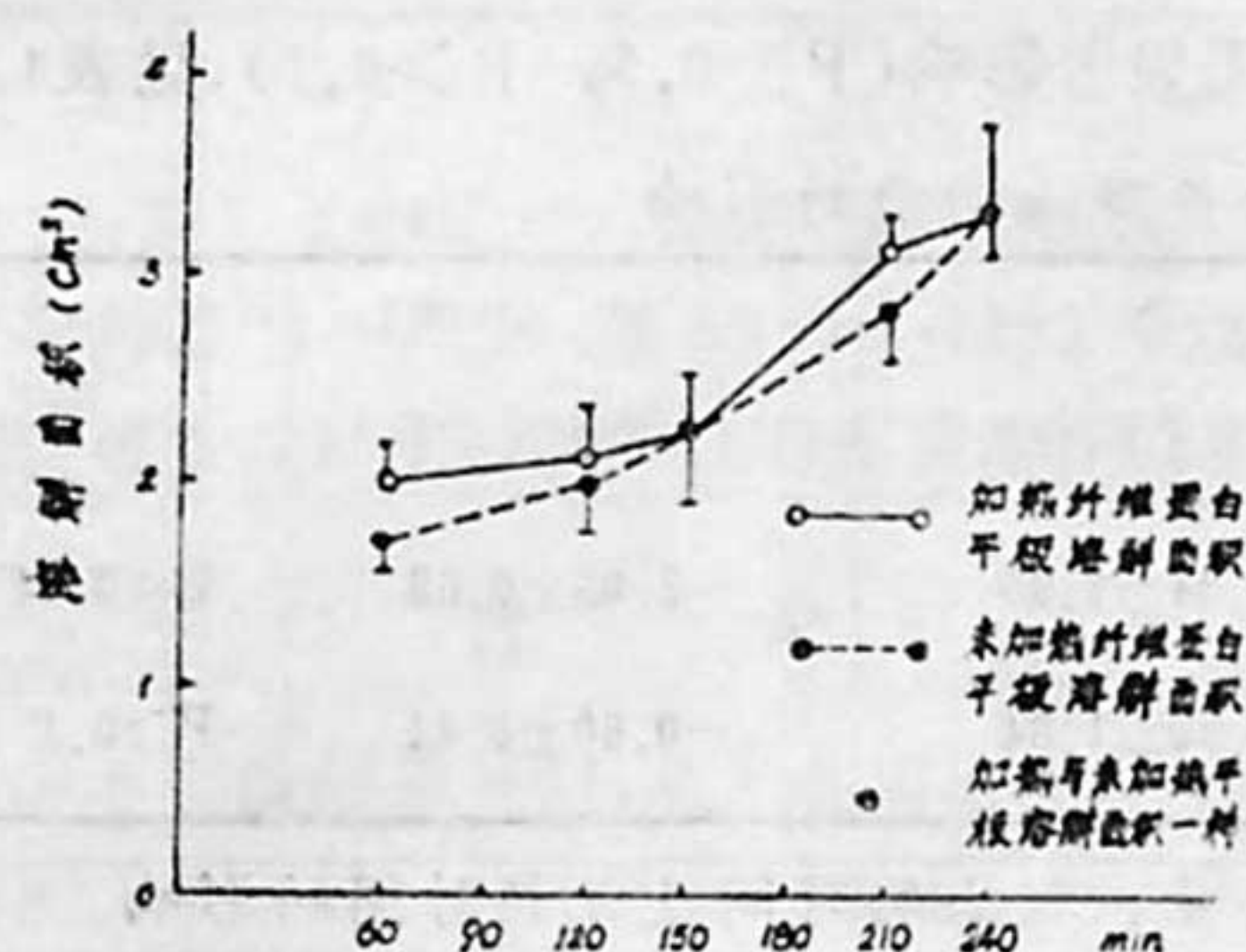


图1 将米曲溶纤维蛋白酶 (500u/ml), 以 0.05ml 滴于加热及未加热纤维蛋白平板上, 观察其各单位时间溶解面积。 (37℃)

2. 图 2 以双对数座标图表示, 当米曲溶纤维蛋白酶浓度大于 160u/ml 时, 3 种含有纤维蛋白原的血浆均未出现可见的凝固现象, 此时取试管内血浆用饱和盐水法进行纤维蛋白

血块收缩试验: 10只兔平均值, 注射前2小时19分血块收缩38.2%; 注射后2小时24分血块收缩37.05%, 无显著差异。

2. 凝血功能测定: 米曲溶纤维蛋白酶注射后, 凝血酶原时间显著延迟($P < 0.01$), 但简易凝血活酶生成试验表明正常($P > 0.1$), 见表2。

3. 纤维蛋白(原)溶解活性试验: 米曲溶纤维蛋白酶注射后5小时, 血浆纤维蛋白

原降低 $105 \pm 18.97\text{mg}\%$, 即下降29.9%, 差异非常显著($P < 0.001$), 而凝血酶时间明显延长($P < 0.025$), 但对复钙时间影响不显著($P > 0.4$), 见表3。

米曲溶纤维蛋白酶注射后24小时, 重复测定血浆纤维蛋白原、凝血酶及复钙时间, 发现血浆纤维蛋白原回升, 而且显著超过正常水平($P < 0.01$), 但凝血酶时间及复钙时间无显著影响($P > 0.5$, $P > 0.1$), 见表4。

表2 米曲溶纤维蛋白酶对白兔凝血功能的影响

项 目	例 数	注 射 前 均数±标准差	注 射 后 均数±标准差	注 射 前 后 均数差±标准误	P 值
一期凝血酶原时间 (Sec)	10	14.29±1.6	16.34±1.96	-2.05±0.59	$P < 0.01$
简易凝血活酶生成 试验(Sec)	10	9.70±0.78	10.30±1.84	-0.60±0.41	$P > 0.1$

表6 米曲溶纤维蛋白酶对白兔血清纤维蛋白(原)降解产物的影响(葡萄球菌聚集试验法)

时 间	葡萄球菌聚集稀释度							
	例数	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
注射前	13	1	5	6	1			
注射后 24小时*	13	2		2	3	2	2	1

* 其中1例未凝集为0

(39.57℃)相比较,无显著发热现象(兔正常体温为38.5~39.5℃)。少数动物发生暂时性食欲减退,但第二日即恢复正常。

讨 论

本实验结果证明,从米曲霉菌株(3.951)的培养液中提取的米曲溶纤维蛋白酶,在加热及未加热纤维蛋白平板上每单位时间的溶解面积无显著差异,提示该酶能直接溶解纤维蛋白平板无需纤溶系统参预,并且随时间延长溶解面积逐渐扩大(图1)。24小时后酶作用减弱或失效,故溶解面积不再扩大。该酶对血浆凝块的溶解与其浓度有密切关系,即酶浓度增高血浆凝块溶解加快(图2),稀释至一定浓度即不能完全溶解。这一结果提示临床使用米曲溶纤维蛋白酶必须有一适当剂量。Frisch⁽¹⁰⁾认为应从血浆中测得米曲溶纤维蛋白酶的抑制物量(brinase inhibitor capacity)作为该酶剂量的依据,这是应该注意的。

此外将米曲溶纤维蛋白酶(500 u/kg)注射

疫学相同,但碎片D⁽¹⁰⁾其分子量估计在71,000至84,000道尔顿之间。

纤维蛋白原链的组成业已阐明⁽²⁰⁾, α 链首先受纤溶酶消化,随后是 β 链和 γ 链。米曲溶纤维蛋白酶也先消化 α 链,但其次是 γ 链而最后是 β 链⁽²¹⁾;Gaffney证明他称之为D(br)的D碎片有很大的不均匀性,是由于 β 和 γ 链降解作用比纤溶酶所引起的更为强烈所致⁽²²⁾。

纤溶酶裂解的纤维蛋白(原)碎片X、Y能使葡萄球菌迅速产生聚集作用⁽²³⁾,但本实验将米曲溶纤维蛋白酶注射于兔,5小时后用葡萄球菌聚集试验测定FDP,聚集反应并不显著(表5),可能由于上述米曲溶纤维蛋白酶所裂解的纤维蛋白原碎片,其分子量及其性质在葡萄球菌聚集试验反应中与纤溶酶所裂解的产物不同有关。

Vanhove⁽²⁴⁾证明,注入米曲溶纤维蛋白酶后,血浆中纤维蛋白原及部分纤溶酶原降解,而且纤维蛋白原的降解作用不激活纤溶酶原——纤溶酶系统。由此可知,动物体内只要有足够浓度的米曲溶纤维蛋白酶,则纤溶系统活动就受障碍,一俟米曲溶纤维蛋白酶作用减弱或消失(体外纤维蛋白平板试验约在24小时以后),纤溶系统立即恢复活动,纤溶酶原转变为纤溶酶裂解纤维蛋白(原)为FDP亦恢复。这与本实验在24小时后用葡萄球菌聚集试验,重复测定FDP时发现聚集反应十分显著(表6)是一致的。提示注射米曲溶纤维蛋白酶24小时以后,其作用减弱或消失,动物体内纤溶系统恢复作用,由纤溶酶所裂解的纤维蛋白原,其X、Y碎片大量增加,所以葡萄球菌聚集反应亦非常显著。

综上所述,根据实验结果使用试验剂量后,米曲溶纤维蛋白酶(3.951),能迅速裂解纤维蛋白(原),对凝血功能无重大影响,且无热原作用,一旦酶的作用消失,纤溶系统及纤维蛋白原等立即恢复正常,作为血栓

性疾病的治疗剂,值得进一步研究。