

新型纳豆激酶- γ -聚谷氨酸复合物注射液的制备和毒性评价

李静¹, 王梦静², 陈杰鹏³, 段丽丽³, 骆翔², 邓意辉², 宋艳志^{2*} (1.锦州医科大学附属第三医院, 辽宁 锦州 121000; 2.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 3.广东双骏生物科技有限公司, 广东 汕头 515000)

摘要: 目的 制备一种低毒性的纳豆激酶(nattokinase, NK)注射液。方法 在NK注射液中加入 γ -聚谷氨酸(γ -polyglutamic acid, γ -PGA), 制备NK- γ -PGA复合物注射液。采用急性毒性试验, 以小鼠给药后的生存时间、生存状态和注射后48 h存活小鼠尾部的状态作为毒性评价的指标, 分别考察pH和 γ -PGA浓度对NK与 γ -PGA复合情况的影响。利用体外溶栓试验对NK- γ -PGA注射液毒性降低的原因进行分析。结果 当以 $120 \text{ kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量单次尾静脉注射NK- γ -PGA复合物注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)时, 48 h后小鼠的死亡率为0, 且尾部无红肿及坏死, 说明在pH 6.0和 γ -PGA的浓度为 $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, NK与 γ -PGA复合得最好。体外溶栓试验结果表明, γ -PGA的加入未降低NK活性, 毒性的降低主要是因为NK与 γ -PGA形成了复合物, 起到了缓释作用。结论 本研究中制备的NK- γ -PGA复合物注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)在不改变NK活性的前提下, 降低了NK注射液毒性。

关键词: 纳豆激酶; 注射液; 聚谷氨酸; 复合物; 急性毒性试验; 体外溶栓试验

中图分类号: R944.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)02-0180-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.02.011

引用本文: 李静, 王梦静, 陈杰鹏, 等. 新型纳豆激酶- γ -聚谷氨酸复合物注射液的制备和毒性评价[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(2): 180-186.

Preparation and Toxicity Evaluation of a Novel Nattokinase- γ -polyglutamic Acid Complex Injection

LI Jing¹, WANG Mengjing², CHEN Jiepeng³, DUAN Lili³, LUO Xiang², DENG Yihui², SONG Yanzhi^{2*} (1. The Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Sungen Biotech Co., Ltd., Shantou 515000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare a low toxicity nattokinase(NK) injection. **METHODS** By adding the γ -polyglutamic acid(γ -PGA) to the NK solution, the NK- γ -PGA complex injection was prepared. Taking survival time, survival state and the tail state of the surviving mouse at 48 h after a single tail intravenous injection as toxicity evaluation indexes, the acute toxicity test was used to study the effects of pH and γ -PGA concentration on the complexation of NK and γ -PGA separately. The *in vitro* thrombolytic test was used to analyze the reason of the toxicity reduction of NK- γ -PGA complex injection. **RESULTS** When the NK- γ -PGA complex injection(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0) was administrated by a single tail intravenous injection at a dose of $120 \text{ kU}\cdot\text{kg}^{-1}$, the death rate of mice was 0, and the mouse tail had no swelling and necrosis, which indicated that when the pH was 6.0 and the concentration of γ -PGA was $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the complexation of NK and γ -PGA was the best. The results of *in vitro* thrombolytic test showed that the addition of γ -PGA did not reduce the activity of the NK, but had a sustained-release effect to reduce drug toxicity. **CONCLUSION** The NK- γ -PGA complex injection(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0) prepared in this study achieved the goal of reducing NK injection toxicity without changing NK activity.

KEYWORDS: nattokinase; injection; γ -polyglutamic acid; complex; acute toxicity test; *in vitro* thrombolytic test

血栓性疾病是指血栓形成和血栓栓塞 2 种病理过程所引起的一类疾病, 其发病率和死亡率很高, 严重威胁着人类的健康^[1]。无论溶栓^[2]或介入^[3]治疗, 实现早期快速的血运重建对于治疗血栓性疾病至关重要^[4]。大多数基层医院无法展开介入手术, 而静脉溶栓治疗始于 20 世纪 80 年代, 实施较为容易, 且疗效已得到肯定^[5]。目前临床上常用的溶栓药物大多为直接的或间接的纤溶酶原激活

剂, 这些溶栓药的应用主要受限于溶栓时间窗^[6], 因此新型溶栓制剂的研发, 对于防治血栓栓塞类疾病意义重大。

纳豆激酶(nattokinase, NK)是一种具有强烈纤溶活性的丝氨酸蛋白酶^[7]。与目前常用的溶栓药物相比, NK 除具有生产工艺简单、稳定性好、半衰期长、特异性强、溶栓活性高等优点外, 其最大的优势在于可以直接溶解纤维蛋白^[8], 溶解陈旧性

作者简介: 李静, 女, 硕士, 药师 Tel: 15704255696 E-mail: syykdxlj@163.com *通信作者: 宋艳志, 女, 博士, 副教授 Tel: (024)43520553 E-mail: songyanzhi@syphu.edu.cn

血栓^[9]。

鉴于 NK 在溶解血栓和预防血栓性疾病的发生等方面的突出疗效,近年来将其作为功能性食品和添加剂的产品不断面世^[10]。但由于 NK 口服制剂难以用于病情危急、昏迷、呕吐的患者,因此将其开发成注射剂更有助于药理作用的发挥^[9]。然而,虽然 NK 的安全性较高,但静脉给药时仍存在容易出血的风险,因此亟需制备低毒性的 NK 注射剂。

从结构上看,NK 是一种碱性蛋白酶,其由 275 个氨基酸残基构成的单链多肽酶,分子量为 28 kDa,表面有 8 个赖氨酸残基,等电点(isoelectric point, pI)为 8.6 ± 0.3 ^[11-12]。当 $\text{pH} < \text{pI}$ 时,其带正电,所以可考虑在 NK 注射液中加入阴离子化合物,通过静电结合,在 NK 周围形成保护层,起到缓释作用,从而降低 NK 毒性^[13]。

γ -聚谷氨酸(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)是由 L-谷氨酸(L-Glu)和 D-谷氨酸(D-Glu)通过肽键结合形成的一种多肽分子,在自然界或人体内能降解成内源性物质 Glu,不易产生蓄积和不良反应^[14]。 γ -PGA 的侧链上具有大量的羧基($-\text{COOH}$),pI 为 2.22^[15],当 $\text{pH} > \text{pI}$ 时,其带负电,易和一些药物结合生成稳定的复合物,是一类理想的体内可生物降解的医药用高分子材料^[14-15]。

在本研究中,尝试将 NK 和 γ -PGA 通过静电结合的方式制备成 NK- γ -PGA 复合物,以达到降低 NK 注射液毒性的目的。

1 材料

1.1 仪器

BS124s 电子分析天平、PB-10 型 pH 计均来自德国赛多利斯公司;DH-2500 电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司);TM-1 动态灭菌器(沈阳天美达科学仪器有限公司);Nicomp-380 激光粒度测定仪(美国 Particle Sizing Systems 公司)。

1.2 药品与试剂

NK 溶液($17.9 \text{ kU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 广东双骏生物科技有限公司,批号:150316); γ -PGA(平均分子量 1 000 kD, 山东福瑞达生物科技有限公司,批号:20131213);琼脂糖(西班牙 Biowest,批号:142075);牛纤维蛋白原(每支 90 mg, 中国药品生物制品检定所,批号:GHSJ-FQPH);凝血酶(每支 500 U, 珠海经济特区生物化学制药厂,批号:20150402);

5%葡萄糖注射液(5%Glu, 辰欣药业股份有限公司,批号:1401210821);50%葡萄糖注射液(50%Glu, 天津药业集团新郑股份有限公司,批号:1410183);灭菌注射用水(石家庄四药有限公司,批号:1509063204);磷酸钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 西陇化工股份有限公司,批号:150309);磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 西陇化工股份有限公司,批号:131104);氯化钠注射液(山东华鲁制药有限公司,批号:7815073107)。

1.3 动物

昆明种小鼠 18~22 g, δ , 60 只,沈阳药科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(辽)2010-0001;新西兰白兔体质量为 2.5 kg, δ , 1 只,沈阳药科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(辽)2014-0002。

2 方法

2.1 NK 注射液的毒性考察

NK 注射液($10 \text{ kU} \cdot \text{mL}^{-1}$)的配制:精密移取 NK 溶液($17.9 \text{ kU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.80 mL 于 5 mL 量瓶中,加入 0.50 mL 50%Glu 注射液,用灭菌注射用水稀释至刻度,摇匀,过 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜,即得。

取 15 只小鼠,随机分成 5 组(每组 3 只),单次尾静脉注射 NK 注射液,给药剂量分别为 150, 120, 100, 80 和 $40 \text{ kU} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。根据给药剂量调整给药体积。在试验期间,记录小鼠给药后的生存时间、生存状态和注射后 48 h 存活小鼠尾部的状态以评价 NK 注射液的毒性。

2.2 γ -PGA 的毒性考察

γ -PGA 溶液($15.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $30.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的配制:分别精密称取 γ -PGA 粉末 30.0 mg 和 60.0 mg 于 2 mL 量瓶中,用 5%Glu 溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

取 6 只小鼠,随机分成 2 组(每组 3 只),单次尾静脉注射 γ -PGA 溶液($30.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $15.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),给药体积为 $0.013 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在试验期间,记录小鼠给药后的生存时间、生存状态和注射后 48 h 存活小鼠尾部的状态以评价 γ -PGA 溶液的毒性。

2.3 pH 对 NK 与 γ -PGA 复合情况影响的考察

2.3.1 不同 pH 的 NK 注射液和 NK- γ -PGA 注射液的配制 NK 注射液($10 \text{ kU} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)的配制:精密移取 NK 溶液($17.9 \text{ kU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.80 mL 于 5 mL 量瓶中,加入适当体积的 NaH_2PO_4

溶液(833 mmol·L⁻¹)或 Na₃PO₄ 溶液(158 mmol·L⁻¹) 调节溶液的 pH 分别为 5.0, 6.0, 7.0 和 8.0, 加入 0.50 mL 50%Glu 注射液, 用灭菌注射用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

NK-γ-PGA 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)的配制: 精密移取 NK 溶液(17.9 kU·mL⁻¹) 2.80 mL 于 5 mL 量瓶中, 加入适当体积的 NaH₂PO₄ 溶液(833 mmol·L⁻¹)或 Na₃PO₄ 溶液(158 mmol·L⁻¹) 调节溶液的 pH 分别为 5.0, 6.0, 7.0 和 8.0, 加入 756 μL γ-PGA 溶液(30.0 mg·mL⁻¹), 加入 0.50 mL 50%Glu 注射液, 用灭菌注射用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 不同 pH 的 NK 注射液和 NK-γ-PGA 注射液的毒性考察 取 24 只小鼠, 随机分成 8 组(每组 3 只), 分别单次尾静脉注射 NK 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, pH 5.0, 6.0, 7.0 和 8.0)和 NK-γ-PGA 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, γ-PGA 4.536 mg·mL⁻¹, pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0), 给药体积为 0.012 mL·g⁻¹(即 NK 的给药剂量为 120 kU·kg⁻¹, γ-PGA 的剂量为 54.30 mg·kg⁻¹)。在试验期间, 记录小鼠给药后的生存时间、生存状态和注射后 48 h 存活小鼠尾部的状态以评价不同 pH 的 NK 注射液和 NK-γ-PGA 注射液的毒性。

2.3.3 不同 pH 的 NK 注射液活性对比 分别精密移取 150 μL pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的 NK 注射液(10 kU·mL⁻¹)于 5 mL 量瓶中, 用灭菌注射用水稀释至刻度, 摇匀。精密移取上述溶液各 10 μL, 分别滴入纤维蛋白平板的加样孔中, 加盖置于 37 °C 恒温箱中孵育 18 h, 使用游标卡尺于平皿背面测量溶圈的垂直两直径(*a*、*b*), 计算溶圈垂直两径乘积 $S(S=a \times b)^{[6]}$ 。

2.4 γ-PGA 浓度对 NK 与 γ-PGA 复合情况影响的考察

2.4.1 不同浓度 γ-PGA 的 NK-γ-PGA 注射液的配制 NK-γ-PGA 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, γ-PGA 0.084, 0.300, 0.924, 4.536 mg·mL⁻¹, pH 6.0)的配制: 精密移取 NK 溶液(17.9 kU·mL⁻¹) 2.80 mL 于 5 mL 量瓶中, 加入 140 μL NaH₂PO₄ 溶液(833 mmol·L⁻¹), 分别加入 14, 50, 154, 756 μL γ-PGA 溶液(30.0 mg·mL⁻¹), 加入 0.50 mL 50%Glu 注射液, 用灭菌注射用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4.2 不同浓度 γ-PGA 的 NK-γ-PGA 注射液的毒性考察 取 15 只小鼠, 随机分成 5 组(每组 3 只),

分别单次尾静脉注射 NK 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, pH 6.0)和 NK-γ-PGA 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, γ-PGA 0.084, 0.300, 0.924, 4.536 mg·mL⁻¹, pH 6.0), 给药体积为 0.012 mL·g⁻¹(即 NK 的给药剂量为 120 kU·kg⁻¹)。在试验期间, 记录小鼠给药后的生存时间、生存状态和注射后 48 h 存活小鼠尾部的状态以评价不同浓度 γ-PGA 的 NK-γ-PGA 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, pH 6.0)的毒性。

2.5 NK-γ-PGA 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, γ-PGA 0.924 mg·mL⁻¹, pH 6.0)毒性降低的原因分析

2.5.1 NK 和 NK-γ-PGA 注射液的配制 NK 注射液(200, 500 U·mL⁻¹)的配制: 分别精密移取 NK 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, pH 6.0) 0.10, 0.25 mL 于 5 mL 量瓶中, 用 5% Glu 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

500 U·mL⁻¹ NK-0.046 2 mg·mL⁻¹ γ-PGA 注射液的配制: 精密移取 NK-γ-PGA 注射液(NK 10 kU·mL⁻¹, γ-PGA 0.924 mg·mL⁻¹, pH 6.0) 0.25 mL 于 5 mL 量瓶中, 用 5% Glu 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

γ-PGA 溶液(0.924 mg·mL⁻¹)的配制: 精密移取 γ-PGA 溶液(30.0 mg·mL⁻¹) 154 μL 于 5 mL 量瓶中, 加入 140 μL NaH₂PO₄ 溶液(833 mmol·L⁻¹), 加入 0.50 mL 50% Glu 注射液, 用灭菌注射用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

γ-PGA 溶液(0.046 2 mg·mL⁻¹)的配制: 精密移取 γ-PGA 溶液(0.924 mg·mL⁻¹)注射液 0.25 mL 于 5 mL 量瓶中, 用 5% Glu 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.2 NK 和 NK-γ-PGA 注射液的体外溶栓作用 家兔心脏采血, 装于医用采样管中保存, 充 N₂, 添加抑菌剂, 于 37 °C 保存 4 d。

取出管中的血凝块并切割成质量约为 0.2 g 的小块, 用 5% Glu 将其表面洗净, 滤纸吸干后精密称重, 分别加入至含有 1.00 mL 不同酶活度的 NK 或 NK-γ-PGA 注射液的西林瓶中, 同时以 5% Glu 和 0.046 2 mg·mL⁻¹ γ-PGA 溶液作为空白对照, 37 °C 恒温孵育, 分别于 0.5, 1.0, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 18, 24 h 时取出瓶中血块, 用滤纸吸干表面液体, 精密称重, 根据公式计算各血块的相对溶蚀率(相对溶蚀率 = $\frac{m_s - m_n}{m_s} \times 100\%$)。

m_s—溶解前的血凝块质量(g); *m_n*—溶解过程中不同时间点称取的血凝块质量(g)。

2.6 NK- γ -PGA 复合物注射液的表征

按照最优处方制备 NK- γ -PGA 复合物注射液, 稀释至适宜浓度, 取适量滴于铜载网上, 1 min 后滤纸吸去多余样液, 2% 磷钨酸溶液进行负染, 30 s 后滤纸吸去余液, 晾干, 于电镜下观察 NK- γ -PGA 复合物形态并拍照。

利用 Nicomp-380 激光粒度测定仪测定 NK- γ -PGA 复合物的粒径与 Zeta 电位。

3 结果与讨论

3.1 NK 注射液的毒性考察

以小鼠给药后的生存时间、生存状态和注射后 48 h 存活小鼠尾部的状态为指标, 对 NK 注射液毒性考察的结果见表 1 和图 1。

随着给药剂量的降低, 小鼠的存活时间延长。150 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠给药后约 0.33 min 死亡; 120 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠给药后约 9 min 死亡; 100 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠给药后最快 138 min 死亡; 而 $\leq 80 \text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠给药后无死亡。

给药剂量不同, 小鼠的状态也不同。150 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 120 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠给药后出现运动减少、嗜睡、呼吸急促、口鼻流血、抽搐现象; 100 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠给药后, 未出现口鼻流血; $\leq 80 \text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠给药后仅出现运动减少、嗜睡、呼吸急促症状。

随着给药剂量的降低, NK 对小鼠注射部位的损伤程度减小。当给药剂量为 80 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 小鼠尾部有不同程度的坏死; 而当给药剂量为 40 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 小鼠尾部无红肿及坏死。结果见图 1。

表 1 NK 注射液($10 \text{kU}\cdot\text{mL}^{-1}$)的毒性考察结果($n=3$)

Tab. 1 Toxicity study results of NK injection($10 \text{kU}\cdot\text{mL}^{-1}$) ($n=3$)

给药剂量/ $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$	死亡率/%	存活时间/min	状态
150	100	0.25, 0.33, 0.33	ccc
120	100	8, 9, 10	ccc
100	100	138, 252, 312	bbb
80	0	\surd, \surd, \surd	aaa
40	0	\surd, \surd, \surd	aaa

注: \surd -48 h 内小鼠未死亡; a-运动减少、嗜睡、呼吸急促; b-运动减少、嗜睡、呼吸急促、抽搐、死亡; c-呼吸急促、口鼻流血、抽搐、死亡。

Note: \surd -the mouse was not dead at 48 h; a-movement reduction, drowsiness and shortness of breath; b-movement reduction, drowsiness, shortness of breath, tetany and death; c-shortness of breath, bleeding from the mouth and nose, tetany and death.

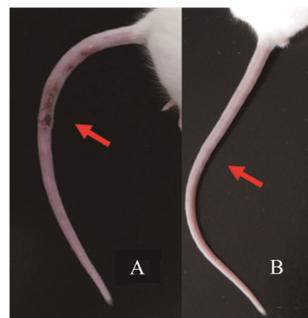


图 1 NK 注射液给药 48 h 后存活小鼠尾部的状态
A-80 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$; B-40 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

Fig. 1 Tail state of the surviving mice 48 h after NK injection
A-80 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$; B-40 $\text{kU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

3.2 γ -PGA 的毒性考察

以小鼠给药后的生存时间、生存状态和注射后 48 h 存活小鼠尾部的状态为指标, 对 γ -PGA 毒性考察的结果见表 2 和图 2。当 γ -PGA 溶液的注射剂量 $\leq 390 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 注射后小鼠的状态无异常, 且小鼠尾部无红肿及坏死。因为 30.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ γ -PGA 溶液的黏度较高, 注射时阻力较大, 所以未考察更高的注射剂量。

表 2 γ -PGA 溶液毒性考察结果($n=3$)

Tab. 2 Toxicity study results of γ -PGA solution($n=3$)

给药剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	死亡率/%	存活时间/min	状态
390	0	\surd, \surd, \surd	无异常
195	0	\surd, \surd, \surd	无异常

注: \surd -48 h 内小鼠未死亡。

Note: \surd -the mouse was not dead at 48 h after injection.

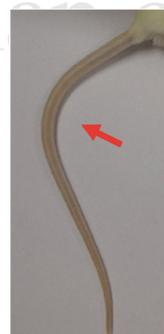


图 2 γ -PGA 溶液 390 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药 48 h 后存活小鼠尾部的状态

Fig. 2 Tail state of the surviving mice 48 h after γ -PGA solution 390 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ injection

3.3 pH 对 NK 与 γ -PGA 复合情况影响的考察

3.3.1 不同 pH 的 NK 注射液和 NK- γ -PGA 注射液的毒性考察 以小鼠给药后的生存时间、生存状态和注射后 48 h 存活小鼠尾部的状态为指标, 对不同 pH 的 NK 注射液和 NK- γ -PGA 注射液毒性考

察的结果见表 3 和图 3。除 NK- γ -PGA 注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $4.536 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)组小鼠未死亡外,其他给药组小鼠均在 11 min 内死亡,注射 NK- γ -PGA 注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $4.536 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0), 48 h 后小鼠尾部红肿。以上结果表明,NK 与 γ -PGA 在 pH 6.0 时复合得最好。

因为 NK 和 γ -PGA 是通过静电作用进行复合的,所以只有当 NK 带较多的正电荷, γ -PGA 带较多的负电荷时,它们才能形成稳定的复合物;反之,当其中一个带电荷偏少时,则不能形成稳定的复合物。NK 的 pI 为 8.6 ± 0.3 , γ -PGA 的 pI 为 2.22,在 pH 6.0 时 NK 和 γ -PGA 都带有较多的电荷,因此形成的复合物较稳定,降低不良反应的作用也就更明显。

表 3 不同 pH 的 NK 注射液和 NK- γ -PGA 注射液的毒性考察结果($n=3$)

Tab. 3 Toxicity study results of NK injection and NK- γ -PGA injection with different pH values($n=3$)

制剂	死亡率/%	存活时间/min	状态
NK (pH 5.0)	100	8, 9, 10	ccc
NK (pH 6.0)	100	8, 9, 11	ccc
NK (pH 7.0)	100	8, 9, 9	ccc
NK (pH 8.0)	100	8, 9, 8	ccc
NK- γ -PGA (pH 5.0)	100	8, 8, 11	ccc
NK- γ -PGA (pH 6.0)	0	\surd , \surd , \surd	aaa
NK- γ -PGA (pH 7.0)	100	8, 10, 10	ccc
NK- γ -PGA (pH 8.0)	100	9, 9, 11	ccc

注: \surd -48 h 内小鼠未死亡; a-运动减少、嗜睡、呼吸急促; c-呼吸急促、口鼻流血、抽搐、死亡。

Note: \surd -the mouse was not dead at 48 h; a-movement reduction, drowsiness and shortness of breath; c-shortness of breath, bleeding from the mouth and nose, tetany and death.



图 3 单次尾静脉注射 NK- γ -PGA 注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $4.536 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)48 h 后存活小鼠尾部的状态
Fig. 3 Tail state of the surviving mice 48 h after a single tail intravenous injection of NK- γ -PGA injection(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $4.536 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)

3.3.2 不同 pH 的 NK 注射液活性对比 采用纤维

蛋白平板法比较不同 pH 的 NK 注射液的活性,结果见图 4。结果表明,4 种 pH 条件下的 NK 注射液($10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 S 值相当,即 NK 注射液($10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$)的活性在 pH 5.0~8.0 范围内较为稳定。

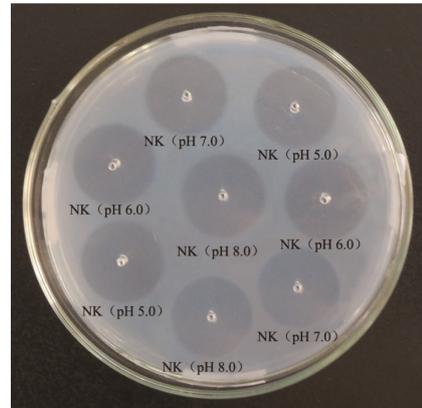


图 4 pH 5.0, 6.0, 7.0 和 8.0 的 NK 注射液($10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$)的活性对比

Fig. 4 Activity comparison of pH 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0 NK injection($10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$)

3.4 不同浓度 γ -PGA 的 NK- γ -PGA 注射液的毒性考察

以小鼠给药后的生存时间、生存状态和注射后 48 h 存活小鼠尾部的状态为指标,对不同浓度 γ -PGA 的 NK- γ -PGA 注射液毒性考察的结果见表 4 和图 5。

当 NK- γ -PGA 注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)中 γ -PGA 的浓度为 $0.084\sim 4.536 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,小鼠的死亡率均为 0。给药后小鼠尾部的状态与 NK 注射液中加入的 γ -PGA 浓度有关,其可能的原因,当 NK- γ -PGA 注射液中 γ -PGA 的浓度较低时,如 0.084 和 $0.300 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,给药 48 h 后小鼠的尾部有坏死现象产生,说明仍有大量游离的 NK 存在;当 NK- γ -PGA 注射液中 γ -PGA 的浓度较高时,如 $4.536 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,给药 48 h 后小鼠尾部有红肿现象,推测产生该现象的原因是, γ -PGA 的浓度较高时, NK- γ -PGA 注射液的黏度较大,注射后部分 NK- γ -PGA 滞留在给药部位, NK 释放导致红肿现象发生;而当 NK- γ -PGA 注射液中 γ -PGA 浓度为 $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,给药 48 h 后小鼠尾部无明显的红肿及坏死现象,说明此时大部分 NK 与 γ -PGA 结合形成了复合物,余下少量的游离 NK 不足以使小鼠的尾巴坏死,另外,该 NK- γ -PGA 注射液的黏度适中,注射后不会滞留在尾部,产生红肿现象。

综上,当 NK- γ -PGA 注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$,

pH 6.0)中 γ -PGA 的浓度为 $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 减毒效果最好。

表 4 不同浓度 γ -PGA 的 NK- γ -PGA 注射液的毒性考察结果($n=3$)

Tab. 4 Toxicity study results of NK- γ -PGA injection with different concentrations of γ -PGA($n=3$)

制剂(pH 6.0)	γ -PGA 的注射剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	死亡率/%	存活时间/min	状态
NK	0	100	8, 9, 10	ccc
NK- γ -PGA (γ -PGA $0.084 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.008	0	√, √, √	aaa
NK- γ -PGA (γ -PGA $0.300 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	3.629	0	√, √, √	aaa
NK- γ -PGA (γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	11.088	0	√, √, √	aaa
NK- γ -PGA (γ -PGA $4.536 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	54.432	0	√, √, √	aaa

注: √-48 h 内小鼠未死亡; a-运动减少、嗜睡、呼吸急促; c-呼吸急促、口鼻流血、抽搐、死亡。

Note: √-the mouse was not dead at 48 h; a-movement reduction, drowsiness and shortness of breath; c-shortness of breath, bleeding from the mouth and nose, tetany and death.

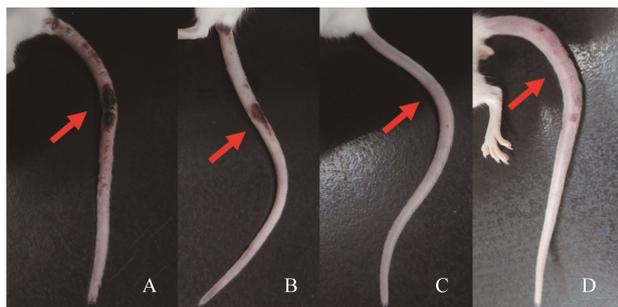


图 5 单次尾静脉注射 NK- γ -PGA 注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)48 h 后存活小鼠尾部的状态

A- γ -PGA $0.084 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; B- γ -PGA $0.300 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; C- γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; D- γ -PGA $4.536 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

Fig. 5 Tail state of the surviving mice 48 h after a single tail intravenous injection of NK- γ -PGA injection(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)

A- γ -PGA $0.084 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; B- γ -PGA $0.300 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; C- γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; D- γ -PGA $4.536 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.5 NK- γ -PGA 注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)毒性降低的原因分析

NK- γ -PGA 注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)毒性降低的原因可能有 2 种: ① γ -PGA 的加入降低了 NK 的活性; ② γ -PGA 与 NK 结合后, 缓慢释放 NK。为了阐明 NK- γ -PGA 注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)毒性降低的原因, 采用体外溶栓试验考察 NK- γ -PGA 注射液 (NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)中 NK 的活性变化。

3.6 NK 和 NK- γ -PGA 注射液的体外溶栓作用

NK 和 NK- γ -PGA 注射液的体外溶栓结果见图 6。NK 对血凝块的溶解速率与其酶活性呈正相关。10 h 时, $500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ NK 注射液的相对溶蚀率即达到 100%, 而 $200 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ NK 注射液仅为 69%。对于 $500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ NK- $0.0462 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ γ -PGA 注射液来说, 在 0~0.5 h 内, 对血凝块的溶解速率低于 $200 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ NK 注射液; 之后其溶解速率快速增加, 在 0.5~2 h 内, 高于 $200 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ NK 注射液而低于 $500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 注射液; 2 h 后与 $500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 注射液相当。

以上结果表明, γ -PGA 的加入未降低 NK 的活性, 毒性的降低主要是因为其与 NK 形成了复合物, 起到了缓释的作用。

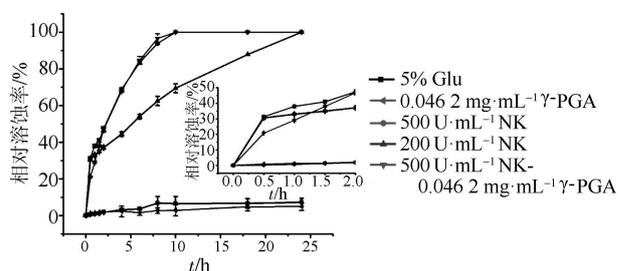


图 6 24 h 内 NK 和 NK- γ -PGA 注射液中血凝块的溶解情况($n=3$)

Fig. 6 Dissolution of blood clots in the NK and NK- γ -PGA injection within 24 h($n=3$)

3.7 NK- γ -PGA 复合物注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)的表征

NK- γ -PGA 复合物注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)为澄清透明的溶液, 该复合物具有纳米结构, 呈球形, 外观圆整, 粒径均匀。电子显微镜图片见图 7。

利用 Nicomp-380 激光粒度测定仪测定该 NK- γ -PGA 复合物的粒径为 $(22.6\pm 5.1)\text{nm}$ ($n=3$), Zeta 电位为 $(-30.6\pm 2.5)\text{mV}$ ($n=3$)。

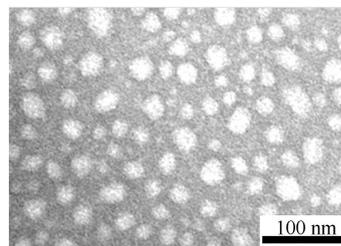


图 7 NK- γ -PGA 复合物注射液(NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)电子显微镜图

Fig. 7 Electron micrograph of NK- γ -PGA complex injection (NK $10 \text{ kU}\cdot\text{mL}^{-1}$, γ -PGA $0.924 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6.0)

4 结论

相比于目前临床上常用的直接的或间接的纤溶酶原激活剂, NK 在治疗血栓栓塞性疾病方面有其独特的优势, 但其又有出血的不良反应。为了充分发挥 NK 的优势, 减小其不良反应, 笔者制备了一种新型的 NK- γ -PGA 复合物注射液, 并进行了体内外的初步评价, 研究结果表明该 NK- γ -PGA 复合物能够在保证 NK 活性的同时降低其毒性, 具有很大的开发前景, 达到了本研究的目的。

REFERENCES

- [1] LUO W P, LUO S X, LIU P H. New oral anticoagulants in treatment of thromboembolic disease [J]. *Adv Cardiovasc Dis*, 2015, 36(3): 303-307.
- [2] FU J X, ZHANG X Y, TIAN W Q, et al. Effect of blood glucose levels on thrombolytic effect of intravenous alteplase for acute cerebral infarction [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2015, 32(10): 1237-1241.
- [3] MA Y, DING Y H, QU B M, et al. Correlation between response variability of platelet aggregation inhibitors and Seattle angina questionnaire in early stage undergoing percutaneous coronary intervention patients [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(4): 587-590.
- [4] 韩雅玲. 急性心肌梗死治疗 30 年[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2015, 7(1): 16-20.
- [5] 邹宝明, 王景武, 徐敏, 等. 瑞替普酶与重组组织型纤溶酶原激活剂治疗急性心肌梗死的疗效比较[J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(36): 4480-4481.
- [6] 陈春燕, 陆学胜, 孙晓江. 重组组织型纤溶酶原激活物静脉溶栓治疗急性脑梗死的疗效[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(21): 6053-6055.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] LI J, SONG Y Z, WANG M J, et al. The comparative study of nattokinase and urokinase [J]. *Chin J Pharmaceut*(中国药理学杂志), 2016, 14(4): 125-134.
- [10] 李淑英, 辛凤姣, 王凤忠. 纳豆激酶, 一种潜在的用于预防与治疗心血管疾病的功能食品添加剂[J]. *生物产业技术*, 2017(6): 100-106.
- [11] GAO Z X, HE L P, LIU Y B, et al. Research progress and prospect of nattokinase [J]. *China Brewing*(中国酿造), 2017, 36(8): 11-15.
- [12] 张淑梅, 李晶, 王玉霞, 等. 纳豆激酶基因工程研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(9): 55-58.
- [13] FENG R, LI J, CHEN J P, et al. Preparation and toxicity evaluation of a novel nattokinase-tauroursodeoxycholate complex [J]. *Asian J Pharmaceut Sci*, 2017, 13(2): 173-182.
- [14] CHENG Y L, ZHAO Y H, WANG H Y. Development of biodegradable polyglutamic acid [J]. *J Beijing Union Uni: Nat Sci*(北京联合大学学报: 自然科学版), 2008, 22(2): 45-49.
- [15] SHI D X. Study on microbial synthesis, purification nature and application of γ -Poly glutamic acid [D]. Harbin University of Commerce, 2010.
- [16] ASTRUP T, MÜLLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40(2): 346-351.

收稿日期: 2019-01-10

(本文责编: 沈倩)

<http://www.chinjmap.com>