

蚯蚓溶栓作用研究进展

北京心肺血管医疗研究中心(100029)

金 鸣*

摘要 蚯蚓提取物在离体及整体条件下可溶解血栓。它可直接溶解纤维蛋白并具纤溶酶原激活剂作用。其活性成分为分子量数万蛋白酶,该提取物毒副作用很低,人口服后可促进纤溶,改善凝血及血液流变学指标。

蚯蚓是寡毛纲动物,《神农本草经》中被列为下品药物^[1]。它可清热、平肝、止喘、通络,主治高热狂躁、惊风抽搐、风热头痛等病症。蚯蚓含蚯蚓解热碱、蚯蚓素、蚯蚓毒素、嘌呤、胆碱、胍等成分,有降压、解热、镇静、抗惊厥等药理作用^[2]。1983年,日本美原恒等人发现人口服蚯蚓水提取物后外周血纤溶活性明显增高^[3]。此后研究表明,蚯蚓提取物口服或静注均可溶解动物血栓,提示以蚯蚓为原料,可望开发出一新型溶栓剂。

1 溶栓药理作用

蚯蚓(地龙)是一平肝熄风中药,已有数千年的使用历史。1983年美原恒首次发现Lumbricidae科蚯蚓水提物有直接溶解纤维蛋白及纤溶酶原激活物作用。健康人口服该药后,纤维蛋白平板法测得外周血优球蛋白的纤溶活性明显增高,优球蛋白溶解时间明显缩短,认为该提取物可望发展为一新型溶栓剂^[3]。路英华等以水提取、盐析、层析法从钼齿远蚓Amyntas dancatala制得蚯蚓纤溶酶,该酶具纤溶及纤溶酶原激活剂活性,可直接溶解纤维蛋白及血凝块^[4]。饶育雄等以颈动静脉间连管内穿线吸附纤维蛋白的模型进行试验,发现十二指肠给参环毛蚓Pheretima aspergillum体腔液冻干粉溶液30mg/kg时,纤维蛋白形成抑制率为 $59.01 \pm 25.89\%$ (设NS组为0%)。该结果与静注1500IU/kgUK组无显著性差异($P > 0.5$)^[5]。张世玲等证明蚯蚓纤溶酶 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4 \text{mm}^2$ 以平板法测得活性数据标定药量,下同)离体条件下可使Chandler血栓形成仪制得的30mg血栓明显减重,这与2000IUUK作用趋势一致, P 均 < 0.05 。家兔静注该酶 $20 \times 10^4 \text{mm}^2/\text{kg}$,20min后凝血时间、凝血酶原时间及复钙时间均明显延长(P 均 < 0.05);5h后,双豚服法测得血浆纤维蛋白原明显下降, $P < 0.01$,3P试验阳性数由给药前的0增至4(与NS组相比 $P < 0.05$)。家兔灌胃 300×10^4 , $600 \times 10^4 \text{mm}^2/\text{kg}$ 及静注 10×10^4 , $20 \times 10^4 \text{mm}^2/\text{kg}$ 该酶后,均可使事先给入肺动脉的血栓明显减重, (P 均 < 0.05)。这些结果均表明,蚯蚓成分经消化道吸收入血或由静脉注入后,有抗凝,促纤溶及促进血栓溶解的作用^[6]。欧兴长以离体实验发现终浓度3.3g生药/L的地龙水提液,可抑制凝血酶催化的纤维蛋白形成反应^[7]。李永吉等以广地龙EtOH提取物家兔静注4g生药/kg后1h,Chandler血栓形成仪检测,与NS组相比,给药组血液粘度下降($P < 0.02$),“雪暴”现象出现时间、特征性血栓形成时间及纤维蛋白血栓形成时间明显推迟($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),血栓长度明显缩短($P < 0.01$),血栓干重下降($P < 0.02$),提示该药有抑制血小板聚集、抗凝、降低血液粘度、抑制血栓形成的作用^[8]。

上述不同方法的实验结果表明,蚯蚓提取物在离体及整体条件下有抗凝及促进纤溶的作用,从而抑制血栓形成、促进血栓溶解,提示以蚯蚓为原料有可能开发出一新型溶栓药。

2 有效成分及其性质

近年来,对蚯蚓提取物的溶栓有效成分进行了一系列研究。1983年,美原恒等以pH梯

*Address: Jin Ming, Beijing Heart Lung and Blood Vessel Medical Center, Beijing

度洗脱法用DEAE-Cellulofine柱从蚯蚓水提物中分得F-I, F-II, F-III 3个部分, 它们皆有纤溶活性, 其等电点依次为1.5, 3.4和5.6。各口服1mg/kg, 均可使健康人外周血纤溶活性明显增高^[3]。其后, 他们又从这个部分中以凝胶过滤法分离得6种具纤溶及纤溶酶原激活物作用的蛋白酶, 其分子量(SDS-PAGE)法分别为32.4, 32.8, 24.5, 27.5, 27.0和27.8KD, 相应的pI依次为3.6, 3.5, 4.1, 4.0, 3.9和3.8。离体条件下这6种酶均可溶解Chandler法制得的血栓^[9]。路英华等以水提、盐析、凝胶层析法从钜齿远蚓*Amyntas dan catala*中提得两pI3-5(IEF法)的纯蛋白酶, 其分子量各为 22.8 ± 2 KD和 40.4 ± 2 KD, 这2成分均可水解纤维蛋白及血凝块^[4]。吴聘等从*Eisenia*属蚯蚓提取纯化得具溶栓活性组分e-TPA, 其SDS-PAGE为2条带, 分子量各为60KD和28KD^[10]。周元聪等从蚯蚓*Eisenia fael-ide*水提取物中以Sephadex G-75柱分得3个峰, 其中第2峰具纤溶活性, 该峰物质以DZAZ Sepharose柱分离得12峰中, 7个峰(B-I~B-VII)具纤溶活性, 以FPLC法从含量较高的B-III及B-VIII中分得纤溶成分B-III-1、B-VIII-1与B-VII-2, 其中, B-VII-1为2条色带, 主带分子量25KD, 另2成分均为分子量30KD的单色带^[11]。徐建民以慈菇蛋白酶抑制剂Sepharose4B柱条和层析法吸附蚯蚓水提物, 洗脱的纤溶成分以MonoQ柱分离, 得11个蛋白峰, 8个峰有纤溶活性, 含量最高峰的9为分子量约27KD的单一色带。上述结果表明, 蚯蚓溶栓成分为多种水溶性酸性蛋白质, 分子量约为20-40KD。一般说来, 蛋白质进入消化道后, 必须被水解寡肽或氨基酸, 才能吸收入血。蚯蚓提取物口服后虽可见血浆纤溶活性增高, 但多次给药后未见明显变态反应, 提示血浆中纤溶活性物质可能为寡肽。

丝氨酸蛋白酶抑制剂利马豆胰蛋白酶抑制剂、N-对甲苯磺酰赖氨酸甲基酮、二异丙基氟磷酸酯等分别可抑制蚯蚓纤溶酶活性的100%、58.3%和11.4%, 提示该酶可能与纤溶酶类似, 为一丝氨酸蛋白酶^[4]。蚯蚓溶栓成分最适pH为中性, 在pH 2的胃液中会被破坏, 改口服给药须用肠溶胶囊。蚯蚓提取物50℃保温30min后活性尚剩余92%, 说明其活性成分对热较稳定。美原恒分别将NS及CaCl₂溶液加入含蚯蚓提取物的人血浆, 37℃反应后测定纤维蛋白降解产物(FDP), 结果表明, NS组FDP为阴性反应, 而CaCl₂组FDP水平明显升高且在一定范围内与蚯蚓提取物浓度成量效关系^[3]。提示在该实验条件下, 该提取物可水解血浆纤维蛋白而不水解纤维蛋白原。路英华等以SDS-PAGE法观察到, 蚯蚓纤溶酶可将缓冲液中的入血纤维蛋白原降解为小分子量片段^[13], 提示美原恒实验中蚯蚓提取物的纤维蛋白特异性作用可能与血浆中某些因子的影响有关。如果在人体内, 蚯蚓成分主要水解纤维蛋白而很少水解纤维蛋白原, 则不易诱发出血, 这是一溶栓剂十分宝贵的特性。

蚯蚓成分溶栓作用机理虽已进行了一定研究, 但许多问题尚未搞清。如该药是否只水解纤维蛋白而很少水解血浆纤维蛋白原; 其水解纤维蛋白的作用点; 该药主要有效蛋白酶的活性中心, 该药口服后经消化、吸收, 其结构的变化及其与活性关系等的研究可充实药物溶栓的理论, 为研究新药、指导临床提供依据。

3 临床研究

郭斗涛等报告, 成年高血粘度综合症及脑血栓患者38例, 口服蚯蚓水提取物30ml/d, 14d为一疗程, 治疗后红细胞压积($P < 0.01$)、血浆粘度($P < 0.01$)、全血粘度($P < 0.001$)、全血还原粘度($P < 0.01$)、纤维蛋白原($P < 0.01$)、血沉($P < 0.001$)及血沉方程K值($P < 0.001$)均有明显改善, 其血液流变学综合指标JG值亦见改善(有效率79%)。提示蚯蚓提取物口服可使脑血栓患者血液流变学指标明显改善^[14]。肾小球疾病多有血液高凝及血栓形成现象。朱长连等报告9例肾小球肾炎患者口服蚯蚓提取物150mg/次, 3次/d, 连服7~14d后,

KPTT, PT, TT均明显延长 (P 均 <0.05), AT-Ⅲ活性上升 ($P<0.05$), FDP增加 ($P<0.05$), 蛋白尿明显减少 ($P<0.05$)^[15]。另外, 董德洛等给脑血栓患者治疗组19例, 安慰剂组8例口服蚯蚓提取物150mg/次, 3次/d, 连续治疗一周后, 给药组KPTT, PT, TT均显著延长 ($P<0.01$), 安慰剂组上述指标给药前后无显著性差异, 给药组与安慰剂组间差异显著 ($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$)。治疗组 α_2 -PI活性给药后明显降低 ($P<0.05$), 安慰剂组改变不明显。治疗组给药后神经功能缺损积分值明显减少 ($P<0.01$), 提示该提取物可能通过抗凝及促纤溶作用, 促进脑血栓患者神经功能缺损的恢复^[16]。蚯蚓提取物的临床应用虽进行了一些探索, 但对其在人体内是否确有溶栓作用, 其作用特点及不良反应尚认识不足。这方面的工作还有待加强。

4 毒副作用

美原恒对蚯蚓提取物进行了急性毒性实验, 结果表明, 3个有效部位F-I, F-II, F-Ⅲ及6种溶纤蛋白酶小鼠口服给药, $LD_{50}>5g/kg$, 这6种蛋白酶小鼠腹腔注射 LD_{50} 分别为9233, 70, 60, 58, 48及20mg/kg, 静脉注射 LD_{50} 分别为33, 38, 104, 135, 88, 及27mg/kg, 提示蚯蚓溶栓成分毒性很低。路英华报告, 大鼠口服蚯蚓纤溶酶25500mm²/d或静脉注射100mm²/d后, 其血压、心率、呼吸频率、深度及一般行为活动均无异常改变, 家兔口服127000mm²/d大鼠灌胃25500mm²/d, 连续16d, 消化道及其他器官均无异常。小鼠腹腔注射该酶2600mm²/d, 16d后处死, 可见部分腹腔粘连肿大充血; 静脉注射5200mm²/d, 连续16d后处死, 可见部分小鼠肺出血, 该酶口服 $LD_{50}>5g/kg$, 静脉注射 $LD_{50}: 80mg/kg$, 小鼠长期毒性实验, 最高剂量36000mm²/d, 每周给药3~4d, 6个月后处死, 未见异常^[4]。姜东胜等从蚯蚓纤溶酶给雄性小鼠灌胃, $LD_{50}>1.5\times 10^8mm^2/kg$, 雌性小鼠灌胃 $LD_{50}>1.5\times 10^7mm^2/kg$ 连续10d, 未见对生长有明显影响, 肝、脾、胸腺、心、肺、肾未见结构改变, 皮下未见明显出血^[17]。上述实验均说明, 蚯蚓溶栓成分的毒副作用很弱。

理想的溶栓剂应可迅速溶解血栓, 无毒, 无出血等副作用, 给药方便, 价格便宜。而目前用于临床的溶栓剂在许多方面仍不理想, 蚯蚓提取物可溶解血栓、毒副作用低, 可口服给药, 且生产成本低廉, 是一较有开发价值的新型溶栓剂。目前, 蚯蚓口服制剂的基础研究已做了一些工作, 但临床应用的报道尚不多, 还应积累更多的资料。为满足临床需要, 应进行蚯蚓提取物静脉注射溶栓剂的研究。由于蚯蚓溶栓活性成分为分子量数万的蛋白质, 反复使用后的变态反应将是一有待解决的问题。蚯蚓溶解血栓的作用机理还有待深入研究, 这种探索可能充实药物溶栓理论, 为临床用药及药物开发提供指导。

参 考 文 献

- 1 黄奭辑. 神农本草经. 北京: 中医古籍出版社, 1982. 323
- 2 江苏新医学院编. 中药大辞典. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 2111
- 3 Mihara H, et al. GB 2116565A
- 4 路英华, 等. 兰州大学学报, 1986, 22(1): 95
- 5 饶育雄, 等. 实用医学杂志, 1986, 2(6): 41
- 6 张世玲, 等. 生化药物杂志, 1987(3): 10
- 7 欧兴长, 等. 中草药, 1987, 18(4): 21
- 8 李永吉, 等. 中医药学报, 1988(2): 46
- 9 Mihara H, et al. EP 0105092
- 10 吴 翀, 等. 生物物理学报, 1986, 2(1): 87
- 11 周元聪, 等. 生物化学与生物物理学报, 1988, 20(1): 35
- 12 徐健民, 等. 上海医科大学学报, 1991, 18(4): 252
- 13 路英华, 等. 生物化学杂志, 1988, 4(2): 166
- 14 郭斗涛, 等. 中西医结合杂志, 1988, 8: 400
- 15 宋长连, 等. 中华肾脏病杂志, 1993, 9(1): 26
- 16 黄德铭, 等. 中国急救医学, 1992, 12(4): 3
- 17 姜东胜, 等. 上海医科大学学报, 1993, 20(1): 16

(1993-07-06收稿)