

豆豉 AprE9912D 血栓溶解酶的制备与活性评价

张 秀, 谭正怀*, 马苗苗, 李晓媛, 周 雪

四川省中医药科学院, 防治重大疾病中药药效学评价平台, 四川省中药质量评价重点实验室, 四川 成都 610041

摘 要: **目的** 通过基因工程技术生产的豆豉血栓溶解酶, 研究其安全性及溶栓功效。 **方法** 采用酪蛋白平板从豆豉中分离获得具有纤溶活性的候选菌株, 利用基因工程技术将其 *AprE9912D* 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3)-pDE1 中过表达 AprE9912D 重组蛋白。经过 Ni-NTA 纯化柱和透析纯化 AprE9912D 重组蛋白, 体外采用纤维蛋白平板、溶解混合血栓考察溶栓作用, 体内采用动静脉旁路血栓模型进行功效评价。同时对其安全性进行初步评估。 **结果** 经过分子鉴定, 筛选出具有纤溶酶活性的菌株是贝莱斯芽孢杆菌 9912D (*Bacillus velezensis* 9912D)。序列分析发现 *AprE9912D* 基因的开放阅读框有 382 个氨基酸, 属于 S8 家族碱性丝氨酸蛋白, 使用 SWISS-MODEL 同源预测 AprE9912D 蛋白 3D 模型。经过 Ni-NTA 柱纯化, AprE9912D 纤溶酶蛋白相对分子质量约为 36 000。体外测得 AprE9912D 纤溶酶活力为 442.6 kU/mg, 2.0 kU/mL AprE9912D 纤溶酶就能有效溶解混合血栓, 其溶解率为 40.0%。在体内, 4.0 kU/kg 能显著抑制动静脉旁路血栓形成, 抑制率为 32.9%。体外溶血显示 AprE9912D 纤溶酶 93.0 U/mL 时, 其溶血率为 3.33%; 测得小鼠静脉注射 AprE9912D 纤溶酶半数致死量 (LD_{50}) > 102.6 kU/kg。 **结论** AprE9912D 纤溶酶具有活性较强、安全性较高的特点, 具有进一步开发的广阔前景。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 过表达; 安全性; 溶栓活性; 血栓溶解酶; 基因工程技术; 大肠杆菌

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)02-0367-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.02.009

Preparation and fibrinolytic activity evaluation of thrombolytic enzyme AprE9912D from Douchi

ZHANG Xiu, TAN Zheng-huai, MA Miao-miao, LI Xiao-yuan, ZHOU Xue

Sichuan Key Laboratory of TCM Quality Evaluation, Evaluation Platform of Pharmacodynamics of TCM for Major Disease Prevention and Treatment, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: **Objective** To study safety and thrombolytic effect of Douchi thrombolytic enzyme produced by genetic engineering technology. **Methods** A candidate strain with fibrinolytic activity was isolated and obtained from Douchi by casein plate. *AprE9912D* gene of the candidate strain was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) - pDE1 to produce the recombinant protein AprE9912D by genetic engineering technology. This protein was purified by Ni-NTA column and dialysis, the fibrin plate and dissolution of the mixed thrombus were using for observing the thrombolytic effect *in vitro*; The rat arteriovenous shunt thrombosis model *in vivo* was used for efficacy evaluation. At the same time, the safety was evaluated preliminarily. **Results** The strain with fibrinolytic activity from screening was *Bacillus velezensis* 9912D by molecular identification. Sequence analysis indicated that the open reading framework of *AprE9912D* gene had 382 amino acids, and belonged to a S8 family Alkaline serine protease; three-dimensional structure of AprE9912D protein was predicted by SWISS-MODEL. The protein molecular weight of AprE9912D fibrinolytic enzyme was 36 000 after purification by Ni-NTA column. Fibrinolytic activity of AprE9912D enzyme *in vitro* was 442.6 kU/mg; 2.0 kU/mL AprE9912D fibrinolytic enzyme could dissolve mixed thrombus effectively, and the thrombolytic ratio was 40.0%. *In vivo*, 4.0 kU/kg AprE9912D fibrinolytic enzyme could significantly inhibit thrombosis in the rat arteriovenous shunt thrombosis model, the inhibition ratio was 32.9%. *In vitro*, the hemolysis test showed that when the concentration of the AprE9912D fibrinolytic enzyme was 93.0 U/mL, the hemolysis ratio was 3.33%. The median lethal dose (LD_{50}) of the AprE9912D fibrinolytic enzyme was greater than 102.6 kU/kg by iv. **Conclusion** The AprE9912D fibrinolytic enzyme has stronger activity and higher safety. It would have broad prospects

收稿日期: 2020-08-18

基金项目: 四川省科技厅基本业务专项 (A-2018N-27); 四川省中医药管理局科学技术研究专项项目 (2018QN040)

作者简介: 张 秀 (1986—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: 771428588@qq.com

*通信作者: 谭正怀, 男, 博士, 研究员, 主要从事中药药理与毒理研究。E-mail: tanzhh616@sohu.com

for further development.

Keywords: *Bacillus velezensis*; overexpression; safety; fibrinolytic activity; thrombolytic enzyme; genetic engineering technology; *Escherichia coli*

流行病学研究结果显示,我国心脑血管疾病的发生率不断上升,心脑血管疾病死亡人数大约占人口总死亡数的 40%~50%;在欧美,其死亡率更高。血栓是引起心肌梗塞、脑中风的重要原因。治疗血栓有介入、手术、抗凝药和溶栓药等方法。尽管血管支架搭桥技术已经相当成熟,但由于支架引起的再狭窄等不良反应大大限制了支架技术的临床应用。至于抗凝疗法多用于预防,难以起到治疗血栓性疾病的目的^[1-2]。

而溶栓药物疗法因具有起效快、操作简单、对患者损伤小、相对价廉等特点而为众多医患所接受。溶栓药发展至今已有 3 代,其中第 1 代溶栓药物具有无纤维蛋白特异性、开通率低和易出血等缺点,如尿激酶;第 2 代溶栓药物则具有半衰期短、颅内易出血和价格贵等缺点,如重组组织型纤溶酶原激活剂 t-PA;第 3 代溶栓药物多采用基因工程制备,具有快速溶栓、半衰期长和开通率高等优点,如瑞替普酶。目前,天然新型溶栓药物如蛇毒、蚯蚓、水蛭素等中药有溶栓作用,虽然价格便宜,但是溶栓效果不佳、有过敏反应等不良反应^[1-2]。因此,寻找效果优良、半衰期长、价格低、不良反应小的溶栓药是目前医药科研工作的当务之急^[3]。

豆豉为常见的大豆发酵食品。有研究显示豆豉中枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 等可以产生纤溶酶,对血栓具有溶解作用^[4-5],但这些菌株所产生的酶至今没有走向市场。本实验报道在重庆永川生产的豆豉中发现了一种能产生溶栓酶的贝莱斯芽孢杆菌 9912D (*Bacillus velezensis* 9912D),然后利用基因工程技术生产出活性强、安全性高的 AprE9912D 纤溶酶,为其后期发展奠定了坚实的基础。

1 材料

1.1 菌种及其质粒

豆豉,配料为黄豆,批号为 20181113,重庆市永川区嘉泰实业有限公司出品;Trelief™5 α 感受态 (TSC01)、pClone007 载体 (TSV-007S)、BL21 (DE3) 感受态 (TSV-A09) 以及 pDE1 表达载体 (TSV-E1) 均由北京擎科生物科技有限公司出品。

1.2 试剂

酪蛋白琼脂 (货号 HB0252,批号 20180526)

购于青岛海博生物公司;牛肉纤维蛋白原 (货号 FB051,批号 514M021)、凝血酶 (货号 T8021,批号 218D0310)、尿激酶 (货号 U8120,批号 715N011) 购于北京索莱宝科技有限公司;卡那霉素硫酸盐 (kanamycin sulfate, Kan, 货号 S17025-25 g,批号 S09M9Y55277) 购于上海源叶生物技术有限公司;L-还原型谷胱甘肽 (批号 EZ3413A111) 和 L-氧化型谷胱甘肽 (批号 EZ3412C306) 购于 BioFroxx 公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG, 货号 I6758-1G,批号 027M4001V) 购于 Sigma 公司。

1.3 试剂盒

细菌总基因组核酸提取试剂盒 (货号 D1600,批号 20181109),北京索莱宝科技有限公司;蛋白提取试剂盒 (货号 C600596,批号 F708DA0001),BBI Life Sciences Corporation;I-5™ 2*High-Fidelity Master mix (货号 I5HM-200, MCLAB)、胶回收试剂盒 (货号 GE0101-50,批号 020180516) 和质粒提取试剂盒 (货号 PM0201-50,批号 020180508),北京擎科生物科技有限公司;一步法细菌活性蛋白提取试剂盒 (货号 C500023,批号 EC26DA0003),生工生物工程(上海)股份有限公司;Ni-NTA 柱 (货号 DP101-01,批号 N10306),北京全式金生物技术有限公司;SP132572-1m 再生纤维素透析袋 (截留相对分子质量大小为 10 000,批号 S10J10G902 19),上海源叶生物技术有限公司;浓缩管 10 000 NMWL (货号 UFC801096,批号 R8NA37711),德国 Merck Millipore 公司。

1.4 动物

昆明种小鼠,SPF 级,四川省中医药科学院动物中心提供,雌雄各半,体质量 18~22 g,生产许可证号 SCXY (川) 2018-19;SD 大鼠,SPF 级,购买于成都达硕实验动物公司,雄性,体质量 220~260 g,生产许可证号 SYXK (川) 2015-030。

所有动物实验遵循四川省中医药科学院动物福利伦理委员会有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。所有动物均饲养在四川省中医药科学院动物中心 SPF 动物屏障系统中。环境使用许可证号 SYXK (川) 2018-100。灯光照明,12 h 光照,12 h 黑暗。自由饮水、摄食,全营养颗粒饲料由四

川省中医药科学院实验动物中心提供。

1.5 仪器

HJ-CJ-2FD 双人单面净化工作台, 上海沪净医疗器械有限公司; 2K15 离心机, Sigma 公司; LGJ-10 冷冻干燥机, 北京松源华光科技发展有限公司; S1000thermal cycler PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司; DYCP-31D 水平核酸电泳仪和 24DN 垂直蛋白电泳仪, 北京六一生物技术有限公司。

2 方法与结果

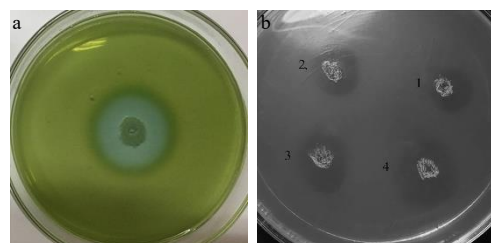
2.1 分离、筛选及鉴定纤溶菌株

取豆豉 5.0 g 加入预置 10 个无菌玻璃珠的三角瓶中, 加入 100 mL 无菌生理盐水, 37 °C、100 r/min 震荡培养 72 h^[6]。吸取 100 μ L 培养液, 用梯度稀释法稀释培养液, 采用平板扩散法将不同稀释度 (1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6}) 的培养液涂布在酪蛋白平板中上培养、分离菌株, 选择有透明圈的菌株, 再重复验证 1 次。

候选菌株用发酵培养基 (10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 牛肉膏, 5 g/L NaCl, pH 7.2~7.6) 37 °C、200 r/min 震荡培养 72 h^[4,7-8]。离心收集上清液。用酪蛋白平板再次验证候选菌株发酵上清液的纤溶活性, 发现

有透明圈及颜色由绿变为蓝, 说明筛选菌株具有纤溶活性, 结果见图 1-a。

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取候选菌株基因组 DNA, 然后采用聚合酶链反应 (PCR) 扩增候选菌株的 *16S rRNA* 基因和 *recA* 基因, S-30 (5'-GTGATCGCAG-3') 单一引物进行随机扩增多态性 DNA 聚合酶链反应 (RAPD-PCR), 并与已有基因库序列进行比对分析, 种属鉴定^[9], 引物序列见表 1。



a-10 μ L 上清发酵液在酪蛋白平板中 b-孔 1~4: 等体积 10、20、35、40 U AprE9912D 纤溶酶在纤维蛋白平板中
a-10 μ L supernatant fermentation broth on the hole of casein plate b-
holes 1—4: the same volume of 10, 20, 35, 40 U AprE9912D
fibrinolytic enzyme on the fibrin plate

图 1 纤溶活性分析

Fig. 1 Fibrinolytic activity assay

表 1 基因扩增所用引物序列

Table 1 Primers used for gene amplification

基因	引物名称	引物序列
<i>16S rRNA</i>	27-F	5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
	1527-R	5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'
<i>recA</i>	recA-F	5'-TGAGTGATGATCGTCAGGCAGCCTAG-3'
	recA-R	5'-CYBTGATAAGARTACCAWGMACCGC-3'
<i>AprE9912D</i> 基因 (pClone007 质粒)	401	5'-CTGAATCCATGGGTGAGAGGCAAAAAGGTATG-3' (下划线为NcoI酶切点)
	Pro490	5'-CTGAATCCATGGCAGGGAAATCAAACGG-3' (下划线为 NcoI 酶切点)
	722-2	5'-GTCGGATCCTTACTGAGCTGCCGCCTGTAC-3' (下划线为 BamH I 酶切点)
<i>AprE9912D</i> 基因 (pDE1 质粒)	Pro490-pDE1	5'-CACCAGGGAAATCAAACGG-3' (CACC 来自 pDE1 质粒)
	722-2-pDE1	5'-TTACTGAGCTGCCGCCTGTAC-3'

采用引物 27-F 和 1527-R 扩增 *16S rRNA* 基因, 在以下条件下进行 PCR: 预变性 94.0 °C、5 min; 94.0 °C、30 s, 56.3 °C、30 s, 72.0 °C、1 min 40 s, 共 35 个循环; 再延长 72.0 °C、10 min。采用引物 *recA*-F 和 *recA*-R 扩增 *recA* 基因, 在以下条件下进行 PCR: 预变性 94.0 °C、5 min; 94.0 °C、30 s, 52.0 °C、30 s, 72.0 °C、1 min, 共 35 个循环; 72.0 °C、10 min。RAPD-PCR 扩增条件: 预变性 94.0 °C、5 min; 94.0 °C、1 min, 32.0 °C、1 min, 72.0 °C、2

min, 共 40 个循环; 再延长 72.0 °C、10 min。PCR 扩增产物经 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析; DNA 核苷酸测序 (擎科生物科技股份有限公司完成); 利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 进行基因序列比对 (BLAST) 分析同源性。

扩增出约 1.4 kb 的 *16S rRNA* 基因同源性分析表明, 具有纤溶活性的菌株可能是枯草芽孢杆菌、*sp* 芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌、暹罗芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌; 同源性比对结果均

为 100%，可以判断属于芽孢杆菌属，但是不能判断出种属。以 S-30 单一引物扩增结果表明，所有菌株均扩增出 1.1、1.5、1.8 kb 条带片段，依其方法无法判断筛选菌株是否属于解淀粉芽孢杆菌，枯草芽孢杆菌或者地衣芽孢杆菌^[9]。扩增出约 0.9 kb 的 *recA* 基因同源性分析表明，筛选出的目标菌株是来自贝莱斯芽孢杆菌，与注释 *recA* 蛋白完全一致。综上结果，筛选出具有纤溶活性的菌株为贝莱斯芽孢杆菌。

2.2 *AprE9912D* 基因开放阅读框比对分析

使用 I-5™ 2*High-Fidelity Master mix，采用 401 和 722-2 引物对来自贝莱斯芽孢杆菌的开放阅读框纤溶基因（open reading frame, ORF）进行扩增，引物序列见表 1：预变性 98.0 °C、2 min；98.0 °C、10 s，56.0 °C、15 s，72.0 °C、20 s，共 35 个循环；再延伸 72.0 °C、5 min。纤溶基因 DNA 序列（结果未呈现）BLAST 比对分析，是来自贝莱斯芽孢杆菌 9912D 菌株。筛选出具有纤溶活性的菌株是为贝莱斯芽孢杆菌 9912D，纤溶基因名为 *AprE9912D* 基因（ORF）。

在 NCBI 上对 *AprE9912D* 基因（ORF）比对分析。ORF 分析：为 1 个 ORF 片段，有 382 个氨基酸（aa）；蛋白功能分析，由信号肽（1-30aa、1-5aa 为 N 区，6-18aa 为 H 区，19-30aa 为 C 区）、肽抑

制剂 19 和成熟肽组成，蛋白为可分泌型，由此判断 *AprE9912D* 蛋白主区域在信号肽后面，过表达时选用去信号肽后的主区域，不同于采用信号肽的过表达^[10]。蛋白质理化性质分析：蛋白质的分子大小为 39 093.10，pI 9.24，去除信号肽后，有 352aa，其蛋白质分子大小为 35 886.22，pI 8.93；保守区域分析见图 2，*AprE9912D* 蛋白，属于碱性丝氨酸蛋白酶，与细胞内碱性丝氨酸蛋白酶 S8 家族具有高度同源性，活性位点（139、171、213、232、261、328），催化位点（Asp139、His171、Ser328）。

采用网站 EMBL-EBI 中 MAFFT 进行氨基酸同源比对，*AprE9912D* 基因（ORF）氨基酸分别与来源于解淀粉芽孢杆菌的 *AprE5-41*（NCBI GenBank: JF739176.1）、*DFE*（NCBI GenBank: DQ132806.1）和 *Subtilisin BPN'*（NCBI GenBank: P00782.1）；与来源于贝莱斯芽孢杆菌的 *AprEBS2*（NCBI GenBank: MH378165.1）和 *ISP-SW5*（NCBI GenBank: MN119493.1）；与来源于枯草芽孢杆菌 *Subtilisin E*（NCBI GenBank: CAA74536.1）；与来源于纳豆枯草芽孢杆菌 *Nattokinase*（NCBI GenBank: FJ374767.1）进行氨基酸同源比对分析，结果见图 3。氨基酸同源比对分析发现其与 *AprEBS2* 同源性为 98.43%^[11]，与 *ISP-SW5* 同源性为 32.60%^[12]，与 *AprE5-41* 同源

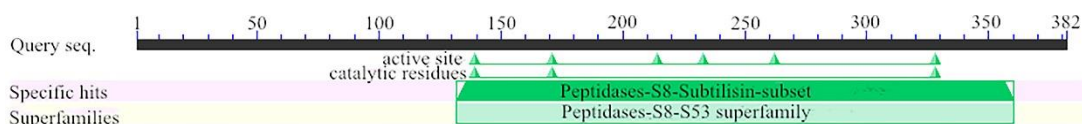


图 2 *AprE9912D* (ORF) 保守区域预测

Fig. 2 Prediction of conserved domain of *AprE9912D* (ORF) protein

<i>AprE9912D</i>	VRGKKVWISLLFALALIFTMAFGSTSPAAGKSNGEKKYIVGFKQTMSTMSAAKKKDV I	60
<i>AprE5-41</i>	MRGKKVWISLLFALALIFTMAFGSTSPAAGKSNGEKKYIVGFKQTMSTMSAAKKKDV I	
<i>DFE</i>	MRGKKVWISLLFALALIFTMAFGSTSPAAGKSNGEKKYIVGFKQTMSTMSAAKKKDV I	
<i>AprEBS2</i>	MRGKKVWISLLFALALIFTMAFGSTSPAAGKSNGEKKYIVGFKQTMSTMSAAKKKDV I	
<i>subtilisin BPN'</i>	MRGKKVWISLLFALALIFTMAFGSTSPAAGKSNGEKKYIVGFKQTMSTMSAAKKKDV I	
<i>subtilisin E</i>	MRSKKLWISLLFALALIFTMAF-SNMSVQAAGKSSTEKKYIVGFKQTMSSAMSSAKKDV I	
<i>nattokinase</i>	MRSKKLWISLLFALALIFTMAF-SNMSAQAAGKSSTEKKYIVGFKQTMSSAMSSAKKDV I	
<i>ISP-SW5</i>	M-----NGEMHLI-----	
	:	. * : *
<i>AprE9912D</i>	SEKGGKVQKQFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDHVAQAYASVPYGVISQ IKA	120
<i>AprE5-41</i>	SEKGGKVQKQFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDHVAQAYASVPYGVISQ IKA	
<i>DFE</i>	SEKGGKVQKQFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDHVAQAYASVPYGVISQ IKA	
<i>AprEBS2</i>	SEKGGKVEKQFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDHVAQAYASVPYGVISQ IKA	
<i>subtilisin BPN'</i>	SEKGGKVQKQFKYVDAASATLNEKAVKELKKDPSVAYVEEDHVAHAYASVPYGVISQ IKA	
<i>subtilisin E</i>	SEKGGKVQKQFKYVNAATLDEKAVKELKKDPSVAYVEEDHIAHEYASVPYGVISQ IKA	
<i>nattokinase</i>	SEKGGKVQKQFKYVNAATLDEKAVKELKKDPSVAYVEEDHIAHEYASVPYGVISQ IKA	

图3 AprE9912D (ORF) 氨基酸序列同源比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of AprE9912D (ORF) with homologous proteins

性为 99.74%，与 *DFE* 同源率为 99.21%，与纳豆激酶同源率为 85.86%，与 *subtilisin E* 同源率为 85.08%，与 *subtilisin BPN'* 同源率为 97.12%。使用 SWISS-MODEL 同源构建 AprE9912D 蛋白 3D 模型，结果见图 4。

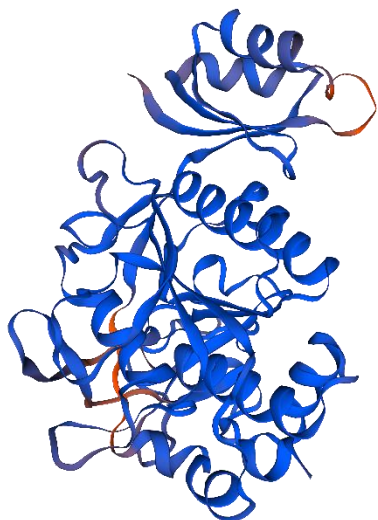


图 4 AprE9912D (ORF) 蛋白 3D 模型

Fig. 4 Three-dimensional structure model of AprE9912D (ORF) protein

贝莱斯芽孢杆菌 9912D 与解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和纳豆枯草芽孢杆菌等芽孢杆菌菌属能够产生相似的纤溶酶，而此类纤溶酶具有较多相似特点：属于 AprE 类型碱性丝蛋白；有高度相似的氨基酸序列；同源 S8 家族蛋白；相似的催化位点、蛋白结构和功能特性；成熟肽相对分子质量大约是 27 000~29 000^[13-14]。

2.3 AprE9912D 纤溶酶基因过表达

使用 I-5™ 2*高保真缓冲液，采用 Pro490 和 722-2 引物对来自贝莱斯芽孢杆菌包含前导肽和成熟肽的 *AprE9912D* 基因进行扩增，扩增条件同 *AprE9912D* 基因 (ORF)，引物见表 1。扩增产物 1.1 kb 构建 Trelief5α-pClone007-AprE9912D 重组转化子。经抗生素筛选、酶切、PCR 扩增外源片段、测序和 NCBI BLAST 比对分析后鉴定重组转化子是否正确。

采用高纯度质粒 DNA 提取试剂盒提取目标 pClone007 质粒。使用 Pro490-pDE1 和 722-2-pDE1 引物扩增目的基因，引物序列见表 1。目的片段经纯化后插入大肠杆菌 BL21 (DE3) pDE1，采用热休克处理转化外源质粒。大肠杆菌 BL21 (DE3) pDE1-AprE9912D 重组转化子经抗生素 Kan 筛选、PCR 扩

增外源片段、测序和 NCBI BLAST 比对分析后鉴定重组转化子是否正确。*AprE9912D* 纤溶酶基因包括前导肽和成熟肽，采用 T7 启动子启动表达，6*His 标签筛选表达蛋白。重组大肠杆菌 BL21 (DE3) pDE1-AprE9912D 构建图，如图 5，获得 *AprE9912D* 基因过表达菌株。

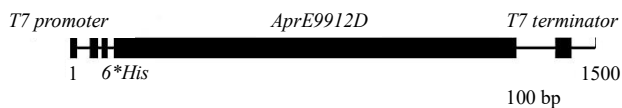


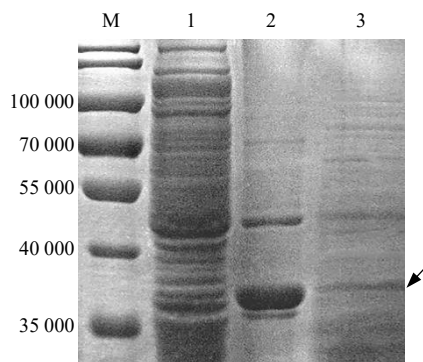
图 5 pDE1 载体中 *AprE9912D* 纤溶酶基因构建图

Fig. 5 Structure of *AprE9912D* fibrinolytic enzyme gene in pDE1 vector

单克隆菌落大肠杆菌 BL21 (DE3) -pDE1-AprE9912D 经过活化和扩大培养，菌液浓度在 600 nm 处的吸光度达到 0.6~0.8 时，添加 0.6 mmol/L IPTG，20 °C 诱导培养 20 h^[13,15-16]。收集菌体，用 PBS 缓冲溶液冲洗菌体 3 次。采用细菌蛋白提取试剂盒提取活性可溶性蛋白，一步法提取试剂盒处理细菌包涵体。SDS-PAGE 电泳分析可溶蛋白及包涵体蛋白相对分子质量，见图 6。

2.4 AprE9912D 纤溶蛋白纯化与复性

结合 Ni-NTA 柱，对“2.3”项所述方法获得的包涵体和可溶性蛋白，进行分离、纯化和透析法复性^[14,17-18]，结果见图 7。经 SDS-PAGE 电泳分析 *AprE9912D* 纤溶酶的相对分子质量为 36 000，如图

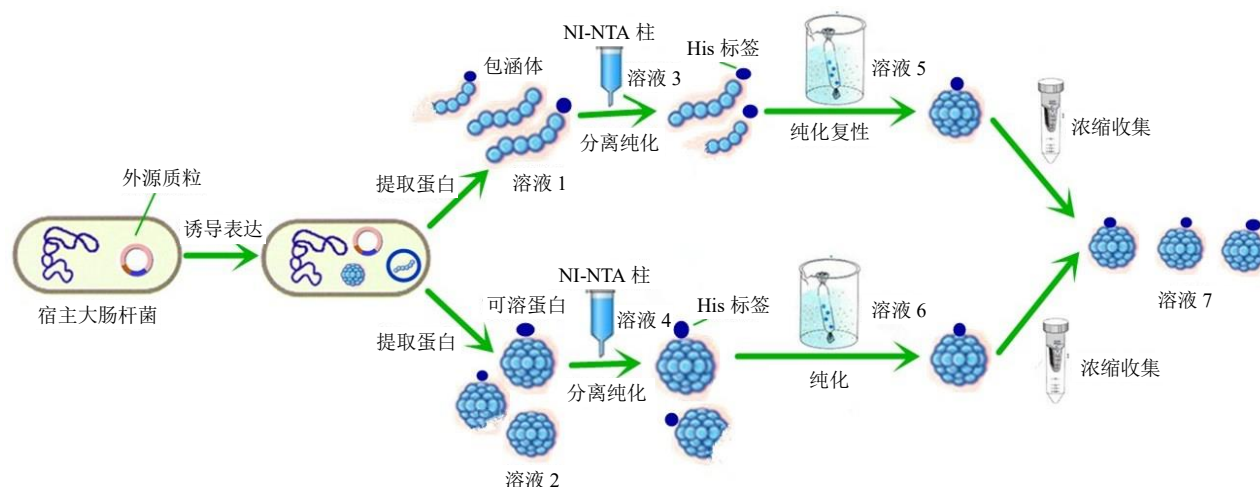


M-蛋白标准品 1-诱导表达后，细菌蛋白提取产物之上清液 2-诱导表达后，细菌蛋白提取产物之包涵体 3-上清液经 Ni-NTA 柱纯化后的可溶蛋白 箭头代表纯化产物，蛋白相对分子质量为 36 000

M-protein molecular weight markers 1-the supernatants of the whole cell lysate after induction 2-the pellets of the whole cell lysate after induction 3-the soluble fraction of the supernatants after Ni-NTA purification the arrow indicates the purification product and protein molecular weight is 36 000

图 6 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis



溶液 1: 8.0 mol/L 尿素, 100.0 mmol/L NaH_2PO_4 , 10.0 mmol/L Tris, pH 8.0, 用于溶解包涵体; 溶液 2: 300.0 mmol/L NaCl, 50.0 mmol/L NaH_2PO_4 , 10.0 mmol/L Tris, pH 8.0, 用于溶解可溶蛋白; 溶液 3: 溶液 1 中加入 10.0~200.0 mmol/L 咪唑, 用于梯度洗脱包涵体中目的蛋白; 溶液 4: 溶液 2 中加入 10.0~200.0 mmol/L 咪唑, 用于梯度洗脱可溶蛋白中目的蛋白; 溶液 5: 透析袋中加入纯化产物、L-还原型谷胱甘肽 (3.0 mmol/L) 和 L-氧化型谷胱甘肽 (0.3 mmol/L), 3 L 烧杯中加入 6.0 mol/L 尿素, 100.0 mmol/L NaH_2PO_4 , 10.0 mmol/L Tris, 5.0% 甘油、1.0% 甘氨酸, pH 8.0, 除尿素浓度呈梯度递减 (4.0、2.0、1.0、0.5、0 mol/L) 外, 其余成分保持不变, 在 4 °C 条件下每隔 12 h 换液, 透析比列 (50 mL : 1 L), 进行目的蛋白透析法复性; 溶液 6: 透析袋中加入纯化产物, 3 L 烧杯中加入 300.0 mmol/L NaCl, 100.0 mmol/L NaH_2PO_4 , 10.0 mmol/L Tris, pH 8.0, 用于目的蛋白透析; 溶液 7: 生理盐水

Buffer 1: 8.0 mol/L urea, 100.0 mmol/L NaH_2PO_4 , 10.0 mmol/L Tris, pH 8.0, in order to dissolve the pellets; Buffer 2: 300.0 mmol/L NaCl, 50.0 mmol/L NaH_2PO_4 , 10.0 mmol/L Tris, pH 8.0, in order to dissolve the soluble fraction; Buffer 3: 10.0—200.0 mmol/L imidazole was added in the buffer 1, in order to purify target proteins with gradient elution in the pellets; Buffer 4: 10.0—200.0 mmol/L imidazole was added in the buffer 2, in order for purification of target proteins with gradient elution in the soluble fraction; Buffer 5: purified products, L-reduced glutathione (3.0 mmol/L) and L-oxidized glutathione (0.3 mmol/L) were added in the dialysis bag. 6.0 mol/L urea, 100.0 mmol/L NaH_2PO_4 , 10.0 mmol/L Tris, 5.0% glycerol, 1.0% glycine were added in the 3 L beaker, pH 8.0, the concentration of urea (4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0 mol/L) decreased gradually, but other composition remained unchanged. The fluid was changed every 12 hours in 4 °C. The dialysis ratio was 50 mL : 1 L in order for renaturation of target proteins; Buffer 6: purified products were added in the dialysis bag; 300.0 mmol/L NaCl, 100.0 mmol/L NaH_2PO_4 , 10.0 mmol/L Tris were added in the 3 L beaker pH 8.0, it was used for purification of target proteins; Buffer 7: physiological saline

图 7 分离纯化与复性流程图

Fig. 7 Flowchart of purification and renaturation

6. 采用纤维蛋白平板法测定纤溶酶纤溶活性, 纤溶活性表示为 kU/mg 蛋白, 孔中分别加入不同浓度的 AprE9912D 纤溶酶, 37 °C 孵育 16 h。以尿激酶为标准品, 用透明圈大小制作标准曲线计算纤维酶活性。以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品, 用 Bradford 法测定蛋白浓度。在纤维蛋白平板上发现都具有纤溶活性, 纤溶酶活力为 442.6 kU/mg, 如图 1-b。纤维蛋白平板有 2 种形式鉴定纤溶活性: 无纤溶酶原和富有纤溶酶原。没有纤溶酶原平板适合于鉴定类纤溶酶活性, 富有纤溶酶原平板适合于鉴定类纤溶酶原激活剂, 而本试验条件下发现 AprE9912D 纤溶酶属于类纤溶酶^[4,19]。AprE9912D 纤溶酶液体经真空冷冻干燥机干燥成粉末, 供后续试验使用及验证其安全性和溶栓功效^[17-18,20]。

2.5 溶栓功效评价

2.5.1 体外对混合血栓的影响 采用雄性大鼠腹主动脉取血制备混合血栓^[21]。将混合血栓切成 103.0~

116.0 mg 的血块, 根据混合血栓质量随机分为 3 组: 对照组、AprE9912D 纤溶酶组和尿激酶组。在等反应体系条件下, AprE9912D 纤溶酶组的试管中分别添加 AprE9912D 纤溶酶, 浓度分别为 0.5、1.0、2.0 kU/mL; 尿激酶组的试管中添加尿激酶, 浓度为 2.0 kU/mL; 对照组的试管中添加 0.5 mL 生理盐水, 37 °C 孵育 16 h。试验结束时, 取剩余血栓在滤纸上吸去水份, 称质量^[22-25]。溶栓率 (M) 计算公式为 $M=(M_0-M_1)/M_0$, 其中 M_0 为初始血栓的质量, M_1 为残余血栓的质量。平行试验 3 次。与对照组相比, AprE9912D 纤溶酶 2.0 kU/mL 可显著溶解血栓, 减轻混合血栓质量, 差异具有统计学意义, 溶栓率为 40.0%, 结果见表 2。

2.5.2 体内对动静脉旁路形成血栓的影响 结合“2.5.1”项体外对混合血栓的溶解情况, 故体内验证实验采用 4.0 kU/kg 的剂量。取雄性 SPF 级 SD 大鼠 (220~260 g), 根据体质量随机分为模型组、尿

激酶组和 AprE9912D 纤溶酶组, 分别尾静脉注射尿激酶 4.0 kU/kg、AprE9912D 纤溶酶 4.0 kU/kg 或等量生理盐水。10 min 后, 用动静脉导管制备动静脉旁路血栓模型, 体外循环 15 min, 取出血栓线, 立即称定质量^[26-28], 总质量减去 6 cm 干缝合线质量即

得血栓质量。血栓率(T)计算公式: $T = (T_0 - T_1) / T_0$, 其中 T_0 为模型组血栓质量, T_1 为药物组血栓质量。与模型组相比, AprE9912D 纤溶酶 4.0 kU/kg 可以显著性抑制大鼠动静脉旁路血栓形成, 血栓形成抑制率为 32.9%^[27-29], 结果见表 3。

表 2 AprE9912D 纤溶酶在体外溶解混合血栓 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Dissolution of mixed thrombus by AprE9912D fibrinolytic enzyme *in vitro* ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度/(kU·mL ⁻¹)	血栓数/个	血栓质量/mg			溶栓率/%
			开始	残渣	溶解	
对照	—	6	105.8±7.2	97.2±11.3	8.7±4.4	8.2
尿激酶	1.0	6	111.3±9.3	103.0±11.0	8.3±6.6	7.5
	2.0	6	108.3±9.8	89.5±10.4	18.8±3.8**	17.4
AprE9912D 纤溶酶	0.5	6	115.5±8.3	109.5±6.6	6.0±3.0	5.2
	1.0	6	103.7±5.7	98.7±6.9	5.0±5.6	4.8
	2.0	6	106.8±8.1	64.2±12.0***	42.7±15.9***	40.0

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

表 3 AprE9912D 纤溶酶对大鼠动静脉旁路血栓形成的 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of AprE9912D fibrinolytic enzyme on arteriovenous shunt thrombosis in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(kU·kg ⁻¹)	动物数/只	体质量/g	线质量/mg	血栓质量/mg	抑制率/%
模型	—	8	247.7±10.1	4.5±0.8	15.5±1.9	—
尿激酶	4.0	6	242.2±6.2	4.3±0.5	11.2±2.0**	27.7
AprE9912D 纤溶酶	4.0	7	240.3±20.5	4.4±0.8	10.4±2.9**	32.9

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

2.6 安全性评估

2.6.1 静脉注射对小鼠急性毒性作用 经预试验发现其急性毒性作用甚小, 无法测出其半数致死量 LD₅₀, 故测定其最大耐受量。正式实验时, 取 SPF 级 18~22 g 昆明种小鼠 20 只, 雌雄各半, 随机分为对照组和实验组。在禁食不禁水 16 h 后, 实验组分别尾静脉注射 AprE9912D 纤溶酶 (102.6 kU/kg), 对照组给予等量生理盐水。观察并记录给药后 14 d 内动物的中毒情况^[5,26]。分别于第 7 天和第 14 天称定质量, 2 周后用脱白法处死未死动物, 称量心、肝、脾、肾、肺等脏器的湿质量, 按照公式计算脏器指数。

脏器指数 = 组织湿质量/体质量

小鼠在给药后 2 周内, 未出现死亡或行为学、排泄物、分泌物等异常现象, 解剖时肉眼未见各主要器官异常。从表 4、5 可见, AprE9912D 纤溶酶对小鼠体质量、脏器指数等指标无明显影响, 与对照组比较差异无统计学意义。AprE9912D 纤溶酶半数

致死量 (LD₅₀) > 102.6 kU/kg。

2.6.2 体外溶血作用 溶血性测定采用改进的 2019 版中国药品检验标准操作规范化学药部分—溶血与凝聚检查法^[30]。从大鼠腹主动脉取血, 玻璃珠去除纤维蛋白原后, 生理盐水清洗 3 次。采用生理盐水稀释成 2.0% 红细胞悬液用于试验, 每支试管中添加 2.5 mL 红细胞悬液, 随机分为 3 组: 阳性组、AprE9912D 纤溶酶组和阴性组。在等体积的条件下, 取不同浓度的 AprE9912D 纤溶酶分别添加到 2.5 mL 红细胞悬液中, 用生理盐水补足 5.0 mL; 阳性组加入 2.5 mL 蒸馏水; 阴性组加入 2.5 mL 生理盐水。37 °C 水浴 3 h, 每 30 min 观察溶血及凝聚情况。3 h 后收集上清液, 检测波长 540 nm 处吸光度 (A) 值, 溶血率按公式溶血率 = $(A_{\text{样本}} - A_{\text{阴性}}) / (A_{\text{阳性}} - A_{\text{阴性}})$ 计算。重复 3 次溶血实验。

经过 3 h 观察, 2.0% 红细胞悬液在体外添加 AprE9912D 纤溶酶之前或之后没有明显的溶血及聚集现象。AprE9912D 纤溶酶最大浓度为 93.0 U/mL

表 4 AprE9912D 纤溶酶对小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of AprE9912D fibrinolytic enzyme on body weight in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(kU·kg ⁻¹)	性别	动物数/只	体质量/g		
				给药前	给药 7 d	给药 14 d
对照	—	♀	5	19.1±1.4	25.6±1.3	32.4±1.6
		♂	5	20.8±1.6	28.9±1.5	38.9±2.2
		♀♂	10	19.9±1.7	27.3±2.2	35.7±3.8
AprE9912D 纤溶酶	102.6	♀	5	18.6±0.9	24.6±1.0	31.3±2.5
		♂	5	20.8±1.6	29.3±0.7	38.1±1.9
		♀♂	10	19.6±1.5	27.0±2.6	34.7±4.1

表 5 AprE9912D 纤溶酶对小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of AprE9912D fibrinolytic enzyme on organ index in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(kU·kg ⁻¹)	性别	动物数/只	脏器指数/(mg·g ⁻¹)				
				心	肝	脾	肺	肾
对照	—	♀	5	5.3±0.3	58.3±7.6	5.9±1.2	10.3±3.4	12.2±1.1
		♂	5	5.1±0.4	47.2±3.2	4.7±1.9	6.7±1.4	14.4±1.3
		♀♂	10	5.2±0.3	52.7±8.0	5.3±1.6	8.5±3.1	13.3±1.6
AprE9912D 纤溶酶	102.6	♀	5	5.7±0.4	51.1±1.9	7.1±1.8	10.6±5.8	13.3±1.0
		♂	5	5.4±0.6	49.8±5.0	6.2±1.2	7.4±1.8	16.1±1.2
		♀♂	10	5.5±0.5	50.5±3.6	6.7±1.5	9.0±4.5	14.7±1.8

时,溶血率为 3.33%,结果见表 6。溶血率不超过 5.0%,与中国国家医药产品管理局《中华人民共和国医药行业标准》和《中国药典》2020 年版相符。

2.7 统计方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。2 组间差异比较采用 Student *T* 检验,应用 SPSS 统计软件进行分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 讨论

目前,临床上常用溶栓酶存在有不良反应问题,

如蝮蛇抗栓酶具有较强的抗原性,引起患者产生过敏反应,干扰治疗效果^[31]。其次,这些酶剂量难以把握,剂量过小,溶栓效果不佳,影响愈后;剂量稍大,则可引起出血,严重者可给患者带来生命危险。再次,这些药品普遍存在价格高,许多患者家庭难以承受。因此,积极寻找溶栓效果好、安全性高的溶栓药物,是许多国内外制药大公司追求的目标之一。

豆豉是人们喜爱的食品,早期有人发现豆豉中

表 6 AprE9912D 纤溶酶溶血及凝聚作用

Table 6 Hemolysis and coagulation induced by AprE9912D fibrinolytic enzyme *in vitro*

组别	剂量/(U·mL ⁻¹)	溶血						聚集	溶血率/%
		0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h	2.5 h	3.0 h		
生理盐水	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AprE9912D 纤溶酶	0.2	—	—	—	—	—	—	—	0.01
	2.0	—	—	—	—	—	—	—	0.23
	10.0	—	—	—	—	—	—	—	0.61
	20.0	—	—	—	—	—	—	—	0.80
	40.0	—	—	—	—	—	—	—	1.25
	93.0	—	—	—	—	—	—	—	3.33
蒸馏水	—	+	+	+	+	+	+	—	—

—: 没有作用; +: 有作用

—: no; +: yes

含有调血脂成分^[32],但由于含量甚微,无法用于临床;近年来,有报道显示豆豉所含的枯草芽孢杆菌具有产生溶栓酶的作用,但由于其含量甚低^[33],无法实现直接从豆豉中提取、分离溶栓酶的目的。本研究首次发现豆豉中所含贝莱斯枯草芽孢杆菌 9912D 同样具有很好的溶栓活性^[11-12],但常规状态下,含量甚微,难以实现用于临床治疗血栓性疾病的目的。因此,本实验在确定其基因序列的基础上,采用基因工程技术,使大肠杆菌大肠杆菌 BL21 (DE3)-pDE1 过表达 *AprE9912D* 基因,初步实现了使用较低的成本可以大量生产具有溶栓活性的 *AprE9912D* 酶的目的,体内外活性研究结果显示 *AprE9912D* 酶具有溶栓活性高、无溶血等不良反应。初步研究表明 *AprE9912D* 酶具有价廉、活性强且安全的特点,初步克服了目前市场上溶栓酶的诸多不确定,提示其广阔的应用前景。

当然,本实验在后续研究中还有许多地方有待进一步完善:如分离纯化技术的效率较低,相关参数不能与工业化生产接轨,目前还不能实现工业化大生产,因此有必要在后期研究中进一步引进高效的分离、纯化技术,使其与工业化大生产接轨;其次,其安全性评价也有待进一步完善,特别是需要回答该药的致敏性问题;在药效学研究中也有待进一步深入研究,特别是其溶栓机理或特点有待进一步系统阐述,以准确回答其成药性问题。

综上所述,在本实验条件下,通过基因工程产生的 *AprE9912D* 纤溶酶作为一种天然新型溶栓剂,克服了豆豉中含量少、不能静脉注射实现快速溶栓的缺点,大大提高了其临床应用前景;同时与目前临床上常用治疗血栓的药物尿激酶比较,具有纯化质量高、溶栓活性好、无明显不良反应等优点。其详细作用机制有待深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 石雕,彭延古.抗血栓中药的研究现状[J].湖南中医药大学学报,2011,31(9):75-78.
- [2] 翁一玲,李煌,吴婷,等.中药有效成分治疗脑卒中的研究概况[J].海峡药学,2019,31(11):33-37.
- [3] Heit J A. Epidemiology of venous thromboembolism [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(8): 464-474.
- [4] Zhang X, Yun L J, Peng L B, *et al.* Optimization of Douchi fibrinolytic enzyme production by statistical experimental methods [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2013, 33(1): 153-158.
- [5] Yuan J, Yang J, Zhuang Z, *et al.* Thrombolytic effects of Douchi fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* LD-8547 *in vitro* and *in vivo* [J]. *BMC Biotechnol*, 2012, 12: 36.
- [6] Purwaeni E, Darojatin I, Riani C, *et al.* Bacterial fibrinolytic enzyme coding sequences from Indonesian traditional fermented foods isolated using metagenomic approach and their expression in *Escherichia coli* [J]. *Food Biotechnol*, 2018, 32(1): 47-59.
- [7] Suwanmanon K, Hsieh P C. Isolating *Bacillus subtilis* and optimizing its fermentative medium for GABA and nattokinase production [J]. *Cyta J Food*, 2014, 12(3): 282-290.
- [8] Jeong S J, Park J Y, Lee J Y, *et al.* Improvement of fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* 168 by integration of a fibrinolytic gene into the chromosome [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(11): 1863-1870.
- [9] Kwon G H, Lee H A, Park J Y, *et al.* Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 129(3): 282-287.
- [10] Cai D, Wei X, Qiu Y, *et al.* High-level expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis* by manipulating signal peptide and signal peptidase [J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 121(3): 704-712.
- [11] Yao Z, Kim J A, Kim J H. Characterization of a fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus velezensis* BS2 isolated from sea squirt jeotgal [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 29(3): 347-356.
- [12] Yang H N, Liu Y, Ning Y C, *et al.* Characterization of an intracellular alkaline serine protease from *Bacillus velezensis* SW5 with fibrinolytic activity [J]. *Curr Microbiol*, 2020, 77(8): 1610-1621.
- [13] Yao Z, Liu X M, Shim J M, *et al.* Properties of a fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* RSB34, isolated from doenjang [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(1): 9-18.
- [14] Jeong S J, Heo K, Park J Y, *et al.* Characterization of AprE176, a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* HK176 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(1): 89-97.
- [15] Xi X, Li X, Wu F, *et al.* Expression, purification and characterization of active untagged recombinant human leukemia inhibitory factor from *E. coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2017, 134: 139-146.
- [16] Jeong S J, Cho K M, Lee C K, *et al.* Overexpression of AprE2, a fibrinolytic enzyme gene from *Bacillus subtilis* CH3-5, in *Escherichia coli* and the properties of AprE2 [J].

- J Microbiol Biotechnol*, 2014, 24(7): 969-978.
- [17] Kotb E. Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from kishk, a traditional Egyptian fermented food [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2015, 51(1): 34-43.
- [18] Jo H D, Lee H A, Jeong S J, *et al.* Purification and characterization of a major fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* MJ5-41 isolated from Meju [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21(11): 1166-1173.
- [19] Yeung J, Li W J, Holinstat M. Platelet signaling and disease: Targeted therapy for thrombosis and other related diseases [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(3): 526-548.
- [20] Zhang S L, Wang Y D, Zhang N, *et al.* Purification and characterisation of a fibrinolytic enzyme from *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* [J]. *Food Technol Biotechnol*, 2015, 53(2): 243-248.
- [21] 史 琪, 关丽娜, 麦培培, 等. 采用人体静脉血体外模拟制备混合性血栓的试验研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(2): 226-229.
- [22] Sun Z B, Liu P P, Cheng G Y, *et al.* A fibrinolytic protease AfeE from *Streptomyces* sp. CC5, with potent thrombolytic activity in a mouse model [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 85: 346-354.
- [23] Choi J H, Kim K J, Kim S. Purification and antithrombotic potential of a fibrinolytic enzyme from shiitake culinary-medicinal mushroom, *Lentinus edodes* GNA01 (agaricomycetes) [J]. *Int J Med Mushrooms*, 2018, 20(1): 47-59.
- [24] Kapoor R, Harde H, Jain S, *et al.* Downstream processing, formulation development and antithrombotic evaluation of microbial nattokinase [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2015, 11(7): 1213-1224.
- [25] Koupenova M, Kehrel B E, Corkrey H A, *et al.* Thrombosis and platelets: An update [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(11): 785-791.
- [26] 张均田, 杜冠华. 现代药理实验方法 [M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2012: 1623-1624, 2164-2170.
- [27] Cai T Q, Wu W Z, Shin M K, *et al.* Factor XII full and partial null in rat confers robust antithrombotic efficacy with no bleeding [J]. *Blood Coagulation Fibrinolysis*, 2015, 26(8): 893-902.
- [28] Ge P, Du L, Han C, *et al.* W1, a novel oral antiplatelet agent with less resistance than clopidogrel [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 69(2): 110-117.
- [29] Cheng G Y, He L Y, Sun Z B, *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. P3 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(9): 1449-1459.
- [30] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 113.
- [31] 张明勇, 袁进. 注射用尖吻蝮蛇血凝酶致过敏性休克 [J]. 中国药物应用与监测, 2011, 8(5): 321-322.
- [32] 李华, 冯凤琴, 沈立荣, 等. 豆豉生理功能的研究进展 [J]. 科技通报, 2009, 25(4): 498-502.
- [33] 张敏, 吴运莉, 王鹏娇, 等. 淡豆豉药材发酵前后活性成分的变化研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(2): 363-364.

[责任编辑 郑礼胜]