

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201903027



单环刺螭不同部位中纤溶酶的 分离纯化及其活性差异

尹哲, 龙莎, 张嘉颖, 於怀龙, 王立强

(华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 对单环刺螭不同部位中的纤溶酶(UFE)进行分离纯化,并比较其活性差异.选择单环刺螭体壁肌、内脏、体腔液作为 UFE 的提取来源,通过离心分离、SephacrylS 100 凝胶柱层析、Q-Sepharose fast flow 阴离子交换层析等工艺获得 UFE 单一组分,采用 Folin-酚试剂法测定其酶活性,并研究 UFE 对 AT-Ⅲ,HC-Ⅱ,凝血因子和钙离子的影响,验证不同部位 UFE 的活性差异.结果表明:从秋季单环刺螭体腔液中提取的总蛋白质量为 39.8 mg,UFE 的比活力为 $4\,695.94\text{ mkat} \cdot \text{g}^{-1}$,纯化倍数为 13.8,明显优于内脏和体壁肌的提取所得;在抗凝作用实验中,加入体腔液中所得 UFE 后,标准血浆、乏 AT-Ⅲ 血浆和乏 HC-Ⅱ 血浆凝血酶原时间、凝血酶时间均极显著延长,加入不同浓度氯化钙后,能显著延长凝血时间,同时,能够极显著降低凝血因子 V,Ⅶ,Ⅷ,Ⅸ,X,Ⅺ 的活性及大鼠血液中的钙离子浓度;不同部位来源的 UFE 活性有较大差异,与内脏及体壁肌相比,体腔液为 UFE 更优提取部位.

关键词: 单环刺螭;纤溶酶;抗凝血;抗凝活性

中图分类号: R 944; Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2020)01-0084-06

Purification and Activity Difference of Fibrinolytic Enzyme From Different Parts of *Urechis unicinctus*

YIN Zhe, LONG Sha, ZHANG Jiaying,
YU Huailong, WANG Liqiang

(School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The activity difference of *Urechis unicinctus* fibrinolytic enzyme (UFE) was compared after separation and purification from different parts. The body wall muscle, viscera and body cavity fluid of *Urechis unicinctus* were selected as the extraction source of UFE, and the single component of UFE was obtained by centrifugation separation, SephacrylS 100 gel column and Q-Sepharose fast flow anion exchange chromatography. The viability of UFE was measured by Folin-phenol reagent method, and the effects of UFE on AT-Ⅲ, HC-Ⅱ, coagulation factors and calcium ions were studied to verify the difference of UFE activity from different parts. The results show that the total protein weight extracted from the body cavity in autumn was 39.8 mg. The specific activity of UFE reached $4\,695.94\text{ mkat} \cdot \text{g}^{-1}$ and the purification ratio was 13.8 times, which was significantly better than that obtained from the visceral and body wall muscles. In the anticoagulation experiment, the levels of prothrombin time and thrombin time in standard plasma, deficient AT-Ⅲ and HC-Ⅱ deficiency prolonged significantly after body cavity fluid of UFE added, and the clotting time also prolonged

significantly after adding different concentrations of calcium chloride. At the same time, it could significantly reduce the activity of coagulation factor V, VII, VIII, IX, X, XIII and the concentration of calcium in rat blood. The activity of UFE in different parts were different, and the body cavity fluid is better as UFE extraction site compared with visceral and body wall muscles.

Keywords: *Urechis unicinctus*; fibrinolytic enzyme; anticoagulation; anticoagulant activity

单环刺螭(*Urechis unicinctus*)体长色红,是常见的底栖生物,多见于我国黄渤海沿岸 U 型浅水区,利用价值极高.对单环刺螭的生物研究最早集中在螭速激肽 I-VIII、血凝素、腺苷酸酶等成分的提取和利用方面^[1-4].王佃亮等^[5]在研究单环刺螭体内生物活性物质的过程中,发现其具有一种纤溶活性的蛋白酶.郭金明等^[6]在前人研究的基础上,从单环刺螭组织液中提取出在体内外均具有较强抗凝、溶栓活性及生物安全性的纤溶酶,并命名为单环刺螭纤溶酶(UFE).UFE 是一种胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶,具有纤维蛋白溶解活性,能明显延长血液凝固时间,产生抗凝血作用^[7].现有的研究对 UFE 的提取部位各异,质量尚未均一化,导致文献报道中结果数据的可信度与重现性较差.本课题组的前期研究表明,单环刺螭肌体中 UFE 的总蛋白质量与季节变化有关,具有季节累积性.基于此,本文对秋季单环刺螭体腔液、体壁肌及内脏等不同部位 UFE 进行分离纯化,并对其活性差异进行研究.

1 实验部分

1.1 实验动物

单环刺螭(山东省青岛市黄岛海域),清洁级,体质量为(40±10) g(生物学成年个体);SD 大鼠(购自厦门大学实验动物中心,动物许可证号为 SYXK(闽)2013-0006),SPF 级,体质量为(200±20) g,雌雄各半.

1.2 仪器与试剂

高速离心机(美国 Beckman 公司);HD-21-88 型核酸/蛋白质检测仪(上海琪特公司);超声波清洗机(上海市爱阔特公司);倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);CO₂ 恒温细胞培养箱(美国 Thermo 公司);真空干燥箱(上海和呈仪器制造有限公司);M600 型凝血因子分析仪(北京中勤世帝科学仪器有限公司);P2-4LD 型冷冻干燥机(北京博医康试验仪器有限公司).

凝血酶时间(TT)诊断试剂盒、凝血酶原时间(PT)诊断试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Q-Sepharose fast flow 阴离子交换层析柱(上海源叶生物科技有限公司);硫酸根(质量分数为 30.26%)、糖醛酸(质量分数为 25.25%)、氨基糖(质量分数为 7.58%)、Folin-酚试剂、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、酪蛋白(赛默上海飞世尔科技有限公司);SephacrylS 100 凝胶柱、Sephadex G-50 葡聚糖凝胶、纤维蛋白原(FIB)测定试剂(福建省泉州市华诺生物科技有限责任公司);标准血浆(上海碧云天生物技术有限公司),乏抗凝血酶-III 血浆(乏 AT-III 血浆)、乏肝素辅因子-II 血浆(乏 HC-II 血浆)(上海冠东生物技术有限公司);肝素钠(≥2 500.5 mkat·g⁻¹,CAS 登录号为 9041-08-1,安徽省合肥市博美生物科技有限公司);其他试剂均为国产分析纯.

1.3 实验方法

1.3.1 单环刺螭分组 于秋季购买单环刺螭成虫,选择体表无伤痕,体态均一的健康个体,于充气的海水(水温为(17.6±0.3)℃,pH 值为 8.01±0.02,实际盐度为 32‰)中暂养 3 d,每日换水 2 次,每次换 1/2 水.实验分 3 批(A~C 批),每批 3 组,每组 10 只.

1.3.2 单环刺螭前处理 将单环刺螭进行以下处理:A 批,剪去一端,挤出内脏,用蒸馏水淋洗后进行组织绞碎,纱布过滤,得内脏匀浆液;B 批,避开内脏,在虫体近头端处剖开长度约 1 cm 的小口,倒提虫体,将体腔液沥出,纱布过滤,得腔液;C 批,剪去一端,挤出内脏,将剩余体壁肌用蒸馏水淋洗后进行组织绞碎,纱布过滤,得壁肌匀浆液.以上过程均在 4℃下进行,处理后于-80℃暂存.

1.3.3 UFE 的提取纯化 将 3 批样品在 4℃下融化,于 3 900 r·min⁻¹离心 60 min,收集上清液,分别于质量分数为 90%,50%的过硫酸铵溶液中透析除盐,经 0.45 μm 微孔滤膜处理后,冷冻干燥,得酶粗品.分别配制 0.2 mol·L⁻¹的酶粗品液上样 SephacrylS 100 凝胶柱,以双蒸水洗脱,收集凝胶柱最上

层的淡黄色条带组分,冷冻干燥,获得最终酶粗品.用 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液将酶粗品的浓度配制为 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,按柱体积的 2%(约 5 mL)向 Q-Sepharose 阴离子层析柱中加样,流速为 $1.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,使用 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 及 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液梯度洗脱;收集的洗脱液以双蒸水为外相,3 500 D 透析袋去离子后冷冻干燥,使双蒸水溶解层析所得冻干品的质量浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,按柱体积的 2%(约 5 mL)向 Sephadex G-50 凝胶柱上样,流出速度为每秒 0.2 滴,每管收集 4 mL 流出组分,冷冻干燥.然后,分别检测 A~C 批的酶活力及比活力.酶活力单位定义:在温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,pH 值为 7.8 的条件下,每分钟水解出相当于 $1\text{ }\mu\text{g}$ 酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位,即 1 个酶活力单位=酪氨酸质量/水解时间 \times 稀释倍数.比活力指单位质量蛋白质所具有的酶活力单位数.

1.3.4 UFE 酶活力的测定 用 Folin-酚试剂法对酶活力进行测定,以酪蛋白为底物.取 1 mL 质量分数为 1%的酪蛋白溶液和 0.9 mL Tris-HCl 缓冲液,加入 0.1 mL UFE 样品溶液,混匀后,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 20 min,加入 1 mL 质量分数为 15%的三氯乙酸溶液终止反应;静置离心 10 min,取上清液作为样品溶液.取 1 mL 质量分数为 1%的酪蛋白溶液和 0.9 mL Tris-HCl 缓冲液,加入 1 mL 质量分数为 15%的三氯乙酸溶液,再加入 0.1 mL 的 UFE 样品溶液,静置离心 10 min,取上清液作为对照溶液.取上述样品溶液和 1 mL 对照溶液,加入 5 mL Folin-酚试剂(甲)及 0.5 mL Folin-酚试剂(乙),混匀于室温放置 30 min 后,在 560 nm 处测定其吸光度 D_{560} .以吸光度 D_{560} 为纵坐标(Y),以蛋白质量为横坐标(X),得标准曲线为 $Y=102.65X-0.214\text{ }3$,相关系数 $R^2=0.999\text{ }8$.

1.3.5 标准血浆、乏 AT-Ⅲ血浆、乏 HC-Ⅱ血浆凝固时间的测定 选择生理盐水作为对照组,按体积比 1:10 分别向标准血浆、乏 AT-Ⅲ、乏 HC-Ⅱ血浆中加入 $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 UFE,以此作为实验组.将凝血酶原时间试剂和凝血酶时间试剂预温 10 min 后,再将各待测组预温 5 min,通过凝血因子分析仪测定凝固时间.

1.3.6 血浆凝血因子活性的测定 选择生理盐水为空白对照, $70\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素钠为阳性对照,3 批 UFE 样品的质量浓度为 $70\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,使用凝血因子试剂盒测定血浆凝血因子活性.

1.3.7 大鼠血体外复钙凝血时间的测定 选择生理盐水作为空白对照, $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素钠作为阳性对照,氯化钙溶液的质量浓度分别为 $3,10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,UFE 的质量浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.大鼠股动脉取血,每 5 mL 血液中加入 0.1 mL 质量分数为 5%的草酸钾溶液,以制备抗凝血.每组加入 0.9 mL 抗凝血,空白对照组中加入 1 mL 生理盐水,阳性对照组中加入 1 mL 肝素钠,实验组中加入 1 mL UFE 溶液,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴条件下,分别加入 0.1 mL 不同质量浓度的氯化钙溶液;每隔 30 s 检查血液状态,当血液不再流动时,记录凝血时间.

1.3.8 大鼠血液中钙离子浓度的测定 选择雌雄大鼠,正常喂养 3 d 后,实验组分别尾静脉注射 $4,16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 UFE 溶液,空白对照组注射 0.5 mL 的生理盐水,阳性对照组注射 $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的肝素钠;30 min 后股动脉采血,于 $3\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,并通过甲基-百里酚蓝比色法测定上清液中钙离子的质量浓度^[6].

1.4 统计分析

采用 SPSS 统计学软件处理实验数据,以平均数 \pm 标准偏差($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示.采用最小显著性差异(LSD)法进行验证,两两对比,当 $P<0.05$ 时,两者的差异具有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 单环刺螈不同部位的分离纯化

2.1.1 样品参数统计 单环刺螈的基本参数统计(体腔液密度为 $1\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$),如表 1 所示.表 1 中: n 为检测次数; m_{av} 为单环刺螈的平均质量; m_{ex} 为单环刺螈提取部位的质量.由表 1 可知:不同部位来源样品的质量不同,体腔液和内脏占单环刺螈质量的比例较为接近,体壁肌则为单环刺螈体质量的主要构成.

2.1.2 粗酶液的吸光度 不同部位来源的样品粗酶液,如图 1 所示.由图 1 可知:B 批样品经过滤、离

表 1 单环刺螈的基本参数统计($\bar{x}\pm\text{SD}$, $n=3$)

Tab.1 Statistics on basic parameters of <i>Urechis unicinctus</i> ($\bar{x}\pm\text{SD}$, $n=3$)			g
样品批次	m_{av}	m_{ex}	
A 批(内脏)	40.80 ± 1.21	7.87 ± 0.37	
B 批(体腔液)	40.18 ± 1.97	8.80 ± 0.25	
C 批(体壁肌)	39.75 ± 2.30	20.37 ± 1.07	

心处理后,与另外两批相比,颜色鲜红,质地粘稠.不同部位样品经 SephacrylS 100 凝胶柱后,其吸光度 D_{560} 如图 2 所示.由图 2 可知:C 批样品蛋白的 D_{560} 最低,A 批次之,B 批的 D_{560} 最高,可达 0.841.因此,体腔液的外观及其粗酶液的 D_{560} 值均优于其他部位.

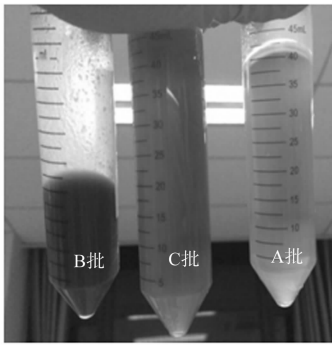


图 1 样品粗酶液

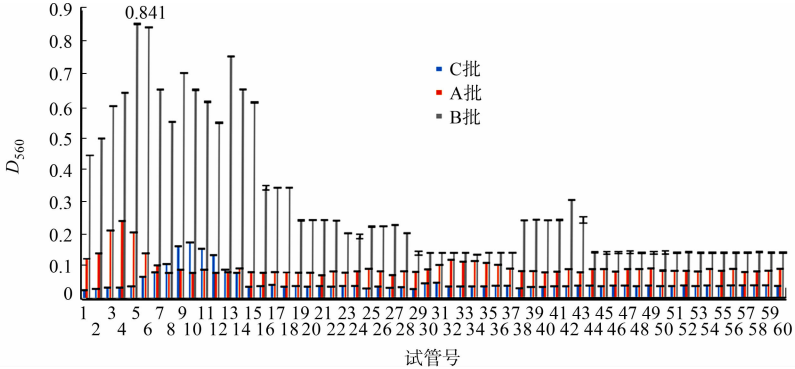


图 2 不同部位样品的吸光度

Fig.1 Sample crude enzyme solution

Fig.2 Optical density values of sample from different parts

2.1.3 样品纯化参数 不同部位来源样品分离纯化过程中的相关参数,如图 3 所示.图 3 中: m_t 为总蛋白质量; k 为纯化倍数;与 A 批组相比,“a”表示 $P<0.01$;与 B 批组相比,“b”表示 $P<0.01$;与 C 批组相比,“c”表示 $P<0.01$.由图 3 可知:不同部位来源样品的参数存在一定差异,体腔液中提取的总蛋白质量为 39.8 mg,UFE 的比活力为 4 695.94 mkat $\cdot g^{-1}$,纯化倍数为 13.8,均高于体壁肌、内脏中所得.

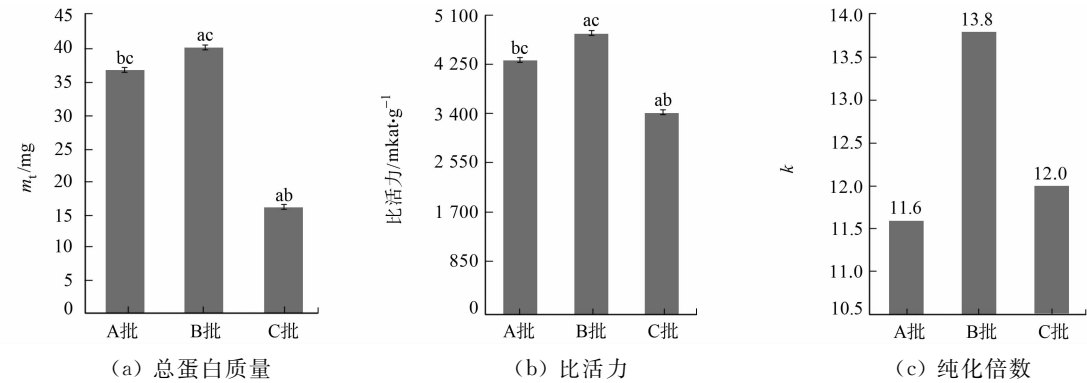


图 3 不同部位来源样品分离纯化过程中的相关参数

Fig.3 Relevant parameters during separation and purification of samples from different parts

2.2 不同部位来源的 UFE 活性差异验证

表 2 UFE 抗凝血酶活性的比较 (n=6)

2.2.1 UFE 抗凝血酶活性 比较不同部位 UFE 的凝血酶原时间和凝血酶时间可知其抗凝血酶活性.UFE 抗凝血酶活性的比较,如表 2 所示.表 2 中: t_P, t_T 分别为凝血酶原时间和凝血酶时间;相比标准血浆,“* *”表示 $P<0.01$;相比乏 AT-Ⅲ 血浆,“a”表示 $P<0.05$,“aa”表示 $P<0.01$;相比乏 HC-Ⅱ 血浆,“bb”表示 $P<0.01$.由表 2 可知:加入 B 批 UFE 后,标准血浆、乏 AT-Ⅲ 及乏 HC-Ⅱ 血浆的凝血酶原时间和凝血酶时间均极显著延长($P<0.01$);加入 A 批 UFE 后,标准血浆和乏 HC-Ⅱ 血浆的凝血酶时间极显著性延长($P<0.01$),而乏 AT-Ⅲ 血浆的凝血酶时间和凝血酶原时间显著延长($P<0.05$);加入 C 批 UFE 的作用不显著.同时,分析数据可知,在相同条件下,UFE 对凝血酶时间的作用更为明显,凝血酶时间大于凝血酶原时间.

Tab.2 Comparison of UFE antithrombin activity (n=6)

组别	t_T/s	t_P/s
标准血浆	14.09±0.97	12.88±0.95
标准血浆+A 批	24.89±3.03* *	12.34±1.20
标准血浆+B 批	26.55±3.62* *	15.47±1.81* *
标准血浆+C 批	16.37±3.11	13.49±1.72
乏 AT-Ⅲ 血浆	13.45±1.28	12.08±1.19
乏 AT-Ⅲ 血浆+A 批	16.78±2.28 ^a	18.85±1.51 ^a
乏 AT-Ⅲ 血浆+B 批	19.82±2.03 ^{aa}	22.35±1.89 ^{aa}
乏 AT-Ⅲ 血浆+C 批	13.57±2.56	14.85±1.91
乏 HC-Ⅱ 血浆	13.88±1.49	12.02±1.54
乏 HC-Ⅱ 血浆+A 批	20.97±2.22 ^{bb}	15.07±2.34
乏 HC-Ⅱ 血浆+B 批	29.73±2.18 ^{bb}	24.73±2.93 ^{bb}
乏 HC-Ⅱ 血浆+C 批	15.07±1.28	13.07±2.37

2.2.2 UFE 对血浆凝血因子活性的影响 UFE 对血浆凝血因子活性的影响结果,如表 3 所示.表 3 中:对照组、肝素钠组、UFE 组 A 批、UFE 组 B 批、UFE 组 C 批的纤维蛋白原(FIB)的质量浓度分别为 (2.69 ± 0.20) , (2.09 ± 0.19) , (2.37 ± 0.21) , (2.23 ± 0.34) , (2.49 ± 0.26) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,与对照组相比,肝素钠组与 3 批 UFE 组的 FIB 质量浓度均低于对照组,未达显著水平,且不具有统计学意义;相比对照组,“*”表示 $P<0.05$,“**”表示 $P<0.01$;相比肝素钠组,“a”表示 $P<0.05$,“aa”表示 $P<0.01$.由表 3 可知:UFE 组 B 批能够极显著降低各凝血因子活性($P<0.01$),UFE 组 A 批能够极显著降低除凝血因子 II 之外的各凝血因子活性($P<0.01$),UFE 组 C 批能够显著降低除凝血因子 II 之外的各凝血因子活性($P<0.05$).此外,与肝素钠组相比,UFE 组 B 批能够极显著地降低凝血因子 II, XI 的活性($P<0.01$),对其他因子不具有统计学意义.

表 3 UFE 对血浆凝血因子活性的影响结果($\bar{x}\pm\text{SD}$, $n=3$)

Tab. 3 Effect of UFE on plasma coagulation factor activity ($\bar{x}\pm\text{SD}$, $n=3$)

%

凝血因子	凝血因子活性				
	对照组	肝素钠组	UFE 组 A 批	UFE 组 B 批	UFE 组 C 批
因子 II	102.37±5.18	53.66±6.85**	89.85±5.05 ^{aa}	74.32±5.09** ^{aa}	97.63±5.19 ^{aa}
因子 V	101.13±6.75	38.13±5.92**	59.48±6.35**	44.86±7.73**	83.25±6.82*
因子 VII	100.53±8.56	52.17±7.10**	70.37±7.49**	56.97±7.67**	82.85±7.30*
因子 VIII	102.08±8.04	51.12±6.43**	58.20±6.64**	48.64±6.39**	69.93±7.45*
因子 IX	101.39±5.46	34.07±4.83**	60.18±5.02** ^{aa}	49.07±6.84**	67.39±6.84*
因子 X	103.07±2.47	48.14±5.86**	65.04±5.33**	56.69±6.08**	88.27±8.52*
因子 XI	101.74±5.07	28.08±6.14**	57.62±6.81** ^{aa}	45.67±5.89** ^{aa}	65.33±4.68*
因子 XII	102.66±8.13	23.06±7.61**	30.09±7.47** ^a	27.64±8.73**	48.41±8.91** ^{aa}

2.2.3 UFE 对大鼠血体外复钙凝血时间的影响 UFE 对大鼠血体外复钙凝血时间的影响,如图 4 所示.图 4 中: $\rho(\text{CaCl}_2)$ 为氯化钙的质量浓度.由图 4 可知:与对照组相比,加入不同质量浓度的氯化钙溶液的肝素钠组均能明显延长凝血时间;相较于对照组,UFE 组 B 批对延长凝血时间的影响最显著,UFE 组 A 批延长凝血时间的效果弱于 UFE 组 B 批,强于 UFE 组 C 批;加入 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯化钙的各组延长凝血时间作用均强于 $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氯化钙的实验组,说明氯化钙的质量浓度越高,延长作用越强,凝血时间越长.

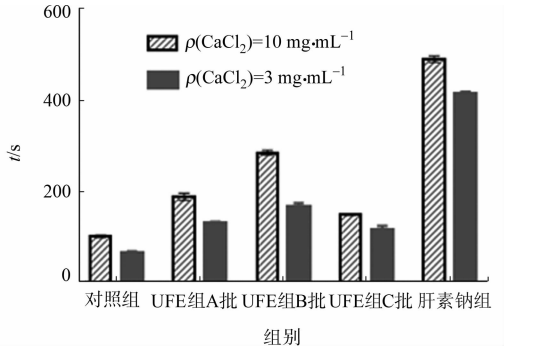


图 4 UFE 对大鼠体外复钙凝血时间的影响

Fig. 4 Effect of UFE on recalcification time of rat calcium *in vitro*

2.2.4 UFE 对大鼠血液中钙离子浓度的影响 UFE 对大鼠血液中钙离子浓度的影响,如表 4 所示.表 4 中: $c(\text{Ca}^{2+})$ 表示钙离子浓度;相比对照组,“*”表示 $P<0.01$;相比肝素钠组,“aa”表示 $P<0.01$.由表 4 可知:UFE 能够降低血液中钙离子的浓度,并存在浓度依赖关系,浓度越高,作用越显著;与对照组相比,各批 UFE 组能够极显著地降低大鼠血液中钙离子的浓度($P<0.01$),肝素钠组未达到显著水平($P>0.05$);不同质量浓度的 UFE 降低作用不同,UFE 组 B 批($4,16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、UFE 组 A 批($16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用极显著($P<0.01$),对钙离子的降低作用强于肝素钠组;3 批 UFE 作用各异,UFE 组 B 批对大鼠血液中钙离子浓度的影响最大.

表 4 UFE 对大鼠血液中钙离子浓度的影响($n=6$)

Tab. 4 Effect of UFE on calcium ion concentration in rat blood ($n=6$)

组别	$c(\text{Ca}^{2+})/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
对照组	3.31±0.21
肝素钠组($4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.95±0.26
肝素钠组($16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.02±0.18
UFE 组 A 批($4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.43±0.22**
UFE 组 B 批($4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.24±0.16** ^{aa}
UFE 组 C 批($4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.78±0.32**
UFE 组 A 批($16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.27±0.24** ^{aa}
UFE 组 B 批($16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.07±0.21** ^{aa}
UFE 组 C 批($16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.67±0.24**

3 讨论

单环刺螈的体壁、消化道和体腔液中均含有丰富的氨基酸,并包含人体需要的各种必需氨基

酸^[8-11]. 现有文献报道中关于单环刺螈纤溶酶的来源部位各异,而具有针对性的抗凝机制研究鲜有报道,极大限制了 UFE 的精准开发与应用. 该实验对不同部位纤溶酶的分离纯化及活性的对比研究,验证了前期针对纤溶酶在体内积累规律研究所获得的结果. 单环刺螈生殖细胞年周期发育分为增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期,单环刺螈的小生殖期为 9 月中旬至 10 月中旬(秋季),生殖细胞的发生主要在体腔液中进行^[12-14]. 该实验发现秋季单环刺螈体腔液中纤溶酶的总蛋白质量丰富,故有待进一步研究单环刺螈生殖细胞发育阶段对机体内环境的影响. 该实验还发现, UFE 能显著降低血浆部分凝血因子的活性,推测 UFE 可能与 AT-Ⅲ 结合,引起 AT-Ⅲ 构象的改变,使 AT-Ⅲ 更易与凝血因子结合,从而灭活或抑制凝血因子的活性;对 HT-Ⅱ 产生钝化作用,使降低血浆中的凝血因子Ⅱ的作用较小. Ca^{2+} 是内环境平衡必不可少的活性离子, Ca^{2+} 作为凝血因子Ⅳ在凝血过程中发挥着重要作用^[15]. 本研究进一步验证 UFE 可通过降低血液中 Ca^{2+} 的浓度来延长大鼠血复钙凝血时间.

通过对比不同部位提取的 UFE 对 AT-Ⅲ、HT-Ⅱ、凝血因子和钙离子的影响可知,体腔液、体壁肌、内脏中的 UFE 在凝血作用机制方面的效应强度各不相同,体腔液中提取的 UFE 作用最强;比较不同部位来源的单环刺螈纤溶酶在总蛋白质量、活性作用方面的差异,初步证实体腔液中 UFE 总蛋白质量最多,且活性优于体壁肌及内脏中所得酶,可以弥补 UFE 质量稳定性的不足. 实验随机选择多个单环刺螈的不同部位进行参数比较,后续工作可增加每一部位的阴性对照来研究每个部位的专属性.

参考文献:

- [1] 韩宝芹,杜芳,毕庆庆,等. 单环刺螈纤溶酶Ⅲ基因克隆及原核表达[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2014,44(3):44-49. DOI:10.3969/j.issn.1672-5174.2014.06.013.
- [2] 初金鑫,蔡文娣,韩宝芹,等. 单环刺螈纤溶酶 UFE-1 的性质和溶栓活性[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(4):661-664. DOI:10.3969/j.issn.1001-6880.2010.04.028.
- [3] JO H Y, JUNG W K, KIM S K. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marineseechiuroid worm, *Urechis unicinctus*[J]. Process Biochemistry,2008,43(2):179-184.
- [4] MATSUBARA K, MATSUURA Y, HORI K, *et al.* An anticoagulant proteoglycan from the marine green alga, *Codium pugniformis*[J]. Journal of Applied Phycology,2000,12(1):9-14. DOI:10.1023/a:1008174115350.
- [5] 王佃亮,刘万顺,韩宝芹,等. 一种新型海洋纤溶酶体外抗凝与溶栓作用研究[J]. 中国海洋药物,2006,25(4):37-42. DOI:10.3969/j.issn.1002-3461.2006.04.009.
- [6] 郭金明,韩宝芹,刘万顺,等. 单环刺螈纤溶酶的分离纯化及其性质的初步研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2008,38(6):951-954,1028. DOI:10.3969/j.issn.1672-5174.2008.06.013.
- [7] 崔青曼,刘萍,王悦,等. 单环刺螈糖胺聚糖抗凝血机制初步研究[J]. 食品工业科技,2015,36(12):337-340. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.12.063.
- [8] 袁春营,刘萍,韩旭,等. 单环刺螈糖胺聚糖组成结构与功能活性研究[J]. 食品工业,2014,35(8):181-183.
- [9] 王银改,刘红霞,胡旭. 自动化测定血清钙的甲基百里酚蓝比色法[J]. 职业与健康,2004,20(2):43-44. DOI:10.3969/j.issn.1004-1257.2004.02.032.
- [10] 杨艳清,许其军,张洁,等. 不同部位来源脂肪干细胞促进血管化的作用比较[J]. 华中科技大学学报(医学版),2018,47(3):318-320,334. DOI:10.3870/j.issn.1672-0741.2018.03.013.
- [11] 李诺,宋淑莲,唐永政,等. 单环刺螈体壁氨基酸组分与含量的分析[J]. 齐鲁渔业,2000,17(5):26-27.
- [12] 李昀,王航宁,邵明瑜,等. 单环刺螈生殖腺的发生及雌体的生殖周期[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2012,42(6):81-84. DOI:10.3969/j.issn.1672-5174.2012.06.013.
- [13] 陈宗涛. 单环刺螈(*Urechis unicinctus*)早期发育的初步研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2005.
- [14] 牛从从. 单环刺螈(*Urechis unicinctus*)生殖细胞的发生、成熟及环境因子对早期发育和变态影响的初步研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2005.
- [15] 朱伟,张家骊,蒋毅,等. 玉足海参糖胺聚糖对血液中钙离子的影响[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(4):462-465. DOI:10.3321/j.issn:1673-1689.2009.04.006.

(责任编辑:钱筠 英文审校:刘源岗)