

尖吻蝮蛇 (*Agkistrodon acutus*) 蛇毒去 纤维蛋白酶 (去纤酶) 对家犬体内抗凝血作用

张洪基 肖昌华 熊郁良 叶智章 蔡景霞 何济之

(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

分别使用5微克/公斤、25微克/公斤、100微克/公斤的剂量,对15只家犬进行了尖吻蝮蛇毒去纤维蛋白酶(简称去纤酶)抗凝血作用的研究。

去纤酶可使三组实验狗(每组5只)血浆中纤维蛋白元非常显著($P < 0.01$)地降低。由于纤维蛋白元的降低而产生的抗凝血作用亦是显著的(给药后5小时所取得的血样在37°C放置24小时以上不凝)这一显著的抗凝血作用至少可以持续24小时。未观察到自发性出血现象或其他毒付作用。表明去纤酶具有较为安全,显著的抗凝血作用。

早期的研究已知蛇毒能影响血液的凝固性能。Ouyang (1957)指出,尖吻蝮蛇毒在体外试验中显示有凝血活性。其后, Ouyang 等人对尖吻蝮蛇毒进行了分离纯化并对其凝血酶样特性进行了研究(1—3)。

根据尖吻蝮蛇毒中所存在的凝血酶样酶,能专一地作用于血浆纤维蛋白元的特性,拟将此酶称为尖吻蝮蛇毒去纤维蛋白酶(以下简称去纤酶)。近几年来,国外在另外一些毒蛇的蛇毒中亦先后发现与去纤酶类似的蛇毒成分,其中以 Ancrod (Arvin) 的研究较为深入。这一酶制剂,主要用于深静脉血栓形成,肺栓塞等栓塞性疾病的抗凝治疗。一些报导认为,这是一个作用专一、安全、高活力、有用的抗凝血新药。

本文对去纤酶的抗凝血作用,以及去纤酶对于外周血象,肝肾功能的影响等进行了研究。

实验材料和方法

1. 去纤酶的分离纯化,用二乙氨基乙基纤维素柱层析法,得到部分纯化的去纤酶。
2. 实验动物:20只体重11—14公斤的杂种家犬,分为4组,每组5只(雌性1只,雄性4只),第1组为对照组,第2组每只给药5微克/公斤,第3组每只给药25微克/公斤,

本文于1977年12月29日收到。

第4组每只给药100微克/公斤。

3. 给药方法：取所需量的去纤酶，用注射用生理盐水稀释到100毫升，在不麻醉的条件下从后肢静脉缓慢推注，30分钟内注完。在给药前一天测定各组的正常值。给药后，分别于药后5小时，1天，2天，4天，7天从后肢静脉取血，供血浆纤维蛋白元等项指标的测定。在药后7天用后肢静脉放血的方法处死动物，作病理解剖及病理切片观察。

4. 血浆纤维蛋白元含量测定：用亚硫酸钠沉淀，双缩脲试剂显色，在540m μ 下进行光度测定。

5. 凝血时间：用试管法进行测定。

实验结果

1. 对家犬血浆纤维蛋白元的作用：从图1—4所示的结果可以看出：

(1) 给药后5小时和24小时，能使三个给药组的血浆纤维蛋白元非常显著地降低 ($P < 0.01$)，药后48小时仍处于低水平 ($P < 0.05$)，可见去纤酶具有显著去体内纤维蛋白元的作用。见表1：

表1 去纤酶对家犬血浆纤维蛋白元的去纤作用

	对照组	5微克/公斤体重		25微克/公斤体重		100微克/公斤体重	
	$\bar{X} \pm S.E$	$\bar{X} \pm S.E$	P	$\bar{X} \pm S.E$	P	$\bar{X} \pm S.E$	P
给药前		399 \pm 125.9		466 \pm 111.8		450 \pm 66.3	
药后5小时	372 \pm 85.6	112 \pm 61.4	<0.01	80 \pm 65.9	<0.01	38 \pm 41.5	<0.01
1天	320 \pm 39.4	126 \pm 43.9	<0.01	144 \pm 52.2	<0.01	92 \pm 66.1	<0.01
2天	378 \pm 41.5	186 \pm 91.3	<0.05	254 \pm 61.8	<0.05	174 \pm 97.1	<0.05
4天	423 \pm 35.1	347 \pm 40.4	>0.05	353 \pm 65.8	>0.05	330 \pm 26.5	>0.05
7天	367 \pm 52.9	387 \pm 77.8	>0.05	365 \pm 84.0	>0.05	380 \pm 80.0	>0.05

2. 对血液凝血时间的作用：从表2可以看出：

表2 去纤酶对家犬凝血时间的作用

给药时间	对照组	5微克/公斤体重	25微克/公斤体重	100微克/公斤体重
给药前	5' 53"	5' 47"	6' 6"	5' 5"
药后5小时	6' 32"	>24小时不凝	>24小时不凝	>24小时不凝
1天	7' 8"	8' 16"	5' 13"	5' 52"
2天	5' 25"	6' 50"	6' 2"	7' 9"
4天	5' 21"	4' 7"	5' 1"	5' 52"
7天	5' 12"	5' 55"	6' 35"	4' 52"

给药后5小时去纤酶能使三个不同剂量给药组的体外凝血时间显著延长(血样在37°C下放置24小时以上不凝),5小时以后逐步恢复正常水平。

3.对外周血象的影响:表3显示去纤酶对狗红细胞计数无影响,均属正常范围。白细胞计数在药后5小时有所上升,超过正常值(正常值为8,000—18,000/mm³平均值为12,000),药后第二天恢复到正常水平。

表3 去纤酶对家犬红、白细胞计数的作用

	红细胞平均数(万/毫米 ³)						白细胞平均数(毫米 ³)					
	给药前	药后5小时	1天	2天	4天	7天	给药前	药后5小时	1天	2天	4天	7天
对 照 组	784	754	715	785	772	765	15,064	13,431	13,394	12,700	13,233	11,400
5毫克/公斤体重	756	739	736	712	704	788	16,940	20,490	12,086	14,269	16,353	15,550
25毫克/公斤体重	799	693	740	726	778	747	18,060	25,920	16,230	17,410	18,217	14,480
100毫克/公斤体重	842	727	706	683	703	710	15,760	19,440	20,250	15,520	10,750	11,330

对血小板、血色素的影响:表4显示血小板,血色素在给药后无明显变化均属正常范围。

表4 去纤酶对家犬血小板、血色素的影响

	血小板平均数(万/毫米 ³)						血色素平均数(克,%)					
	给药前	药后5小时	1天	2天	4天	7天	给药前	药后5小时	1天	2天	4天	7天
对 照 组	31.2	30.5	30.2	31.6	33.3	32.3	9.5,71	9.2,66	9.1,64	9.7,72	9.7,68	9.5,64
5毫克/公斤体重	29.6	34.6	20.8	31.6	30.31	30.3	9.7,71	9,62	8.8,59	8.5,58	8.8,59	8.3,59
25毫克/公斤体重	28.9	29.4	26.0	36.2	27.3	24.6	10.1,76	8.6,59	8.6,59	9.2,62	8.8,57	9.3,62
100毫克/公斤体重	25.5	32.4	29.3	29.5	24.1	32.4	9.8,73	8.8,64	8.2,56	9.6,66	8.7,57	8.6,55

对白细胞分类的影响:表5显示对白细胞分类无明显影响,均属正常范围。

4.对肝肾功能的影响:去纤酶对家犬血液中非蛋白氮及肝功能无影响,均属正常范围。

5.对体温的影响:表6显示对狗体温无影响,均属正常范围。

9.病理解剖及病理切片观察:皮下、脑、肝、肾、胃、肠、脾、心、肾上腺等无出血及变形的现象;切面观察无可见的病变,仅个别家犬于肺部,脾门附近有微小出血点,但在对照组亦有个别出现微小出血点,这是否与处死时,实验动物猛烈挣扎,造成微血管破裂有关,有待进一步研究。

肝、肾、脾、肾上腺、胃、十二指肠、结肠、小肠、心、肺等病理切片未见病理改变,个别动物有淋巴浸润、充血等现象,但属陈旧性病变,且在对照组亦有发现。

表 5 去纤酶对家犬白细胞分类的影响

	对 照 组						5毫克/公斤体重						25毫克/公斤体重						100毫克/公斤体重												
	给药前		1天		2天		4天		7天		给药前		1天		2天		4天		7天		给药前		1天		2天		4天		7天		
中性分叶核	49.4	47.4	56	51.4	47.4	55.3	54	55.8	43.6	45.8	53	58	54.4	59	51.2	51	45	43	56	50.2	54.3	54.6	64.3	64.2							
中性杆状核	16.5	16.2	16.6	14.8	15.3	13	12.2	12.8	16.5	26	21.3	21.5	15.2	20.6	24.8	16.6	16	19.7	9.6	14.3	12	11.8	8.3	10							
嗜酸核	3.5	6	4.5	5.2	3	3	6	5.6	9.2	8.6	4	2.5	5.2	4	3.2	5.4	6.3	7.6	8.0	8.0	6.2	8	5	3							
淋 巴	29.6	36.6	23.6	27.6	22.3	28	25.4	25.2	29.6	24.3	22	19.2	20.4	18.2	20.2	26.2	30.5	30	22.3	30.5	25.5	23	19.2	22.6							
单 核	1	1.2	1	1.3	2	1	2.5	2	1	0	0	1	1.25	1.5	1	1	0	1	1	1	0	1	1	2							

表 6 去纤酶对家犬体温 (°C) 的影响

	给 药 前			给 药 后			
	给药前	5 小时	1 天	2 天	4 天	7 天	7 天
5 毫克/公斤体重	38.9	38.8	39.0	38.9	38.8	39.3	39.3
25 毫克/公斤体重	39.4	39.7	39.0	39.0	38.7	39.0	39.0
100 毫克/公斤体重	39.5	39.1	39.2	39.6	39.1	39.1	39.1

讨 论

分别使用 5 微克/公斤、25 微克/公斤、100 微克/公斤的剂量, 去纤酶可使三组实验狗的血浆纤维蛋白元非常显著 ($P < 0.01$) 地降低。由于纤维蛋白元的降低而产生的抗凝血作用亦是显著的 (给药后 5 小时所取的血样在 37°C 下放置 24 小时以上不凝)。

三个给药组, 在给药后 5 小时出现白细胞计数超过正常值的现象 (药后 2 天以后恢复到正常水平), 除这一轻微的刺激反应外, 去纤酶对红细胞计数, 白细胞分类、血色素、血小板、肝肾功能、体温、病理解剖、病理切片等无影响, 都属于正常。未观察到自发性出血症状, 而自发性出血并发症是目前一些较受重视的抗凝血药如肝素、链激酶等难以克服的副作用。

从本文所获得的试验结果及其它资料 (4—5) 表明, 去纤酶具有较为安全、显著的抗凝血作用。这一新型蛇毒酶制剂的研究有助于对出血与血栓机制的理论探讨及用于临床血栓病人的治疗, 因此具有一定的理论与实际意义。

本文承我所四室生理组, 昆明市延安医院及昆明医学院附一院的大力协助特此致谢。

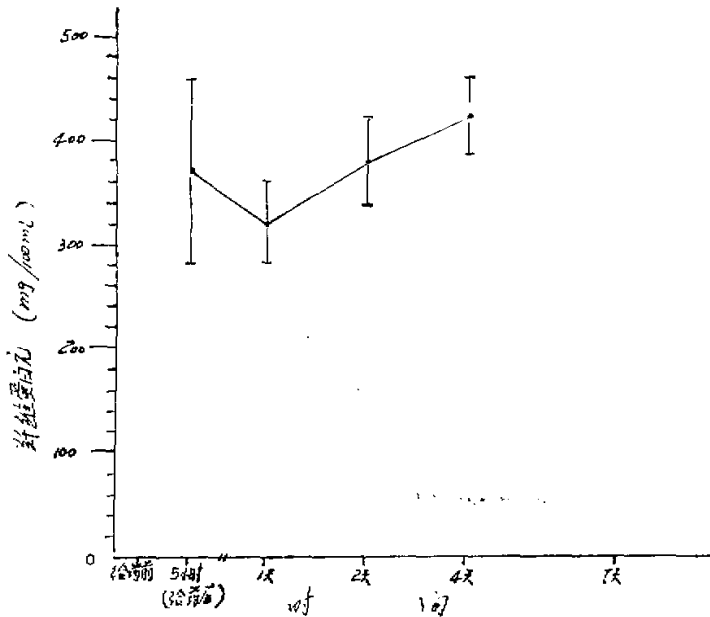


图 1 去纤酶对家犬 (对照组, $n = 5$) 血浆纤维蛋白元的作用

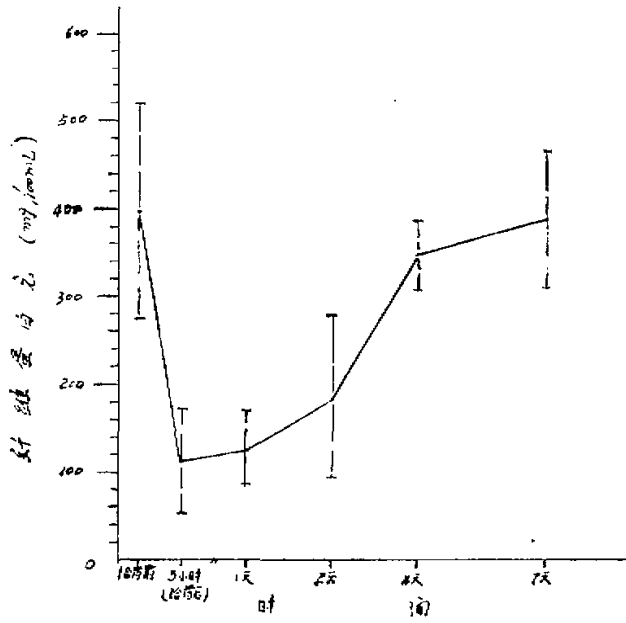


图2 去纤酶对家犬(每只给药剂量, 5毫克/公斤, n=5) 血浆纤维蛋白元的作用。

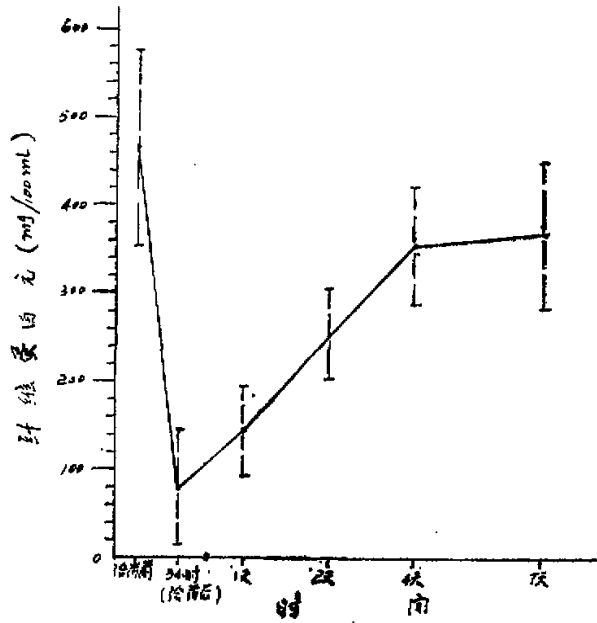


图3 去纤酶对家犬(每只给药剂量, 25毫克/公斤, n=5) 血浆纤维蛋白元的作用。

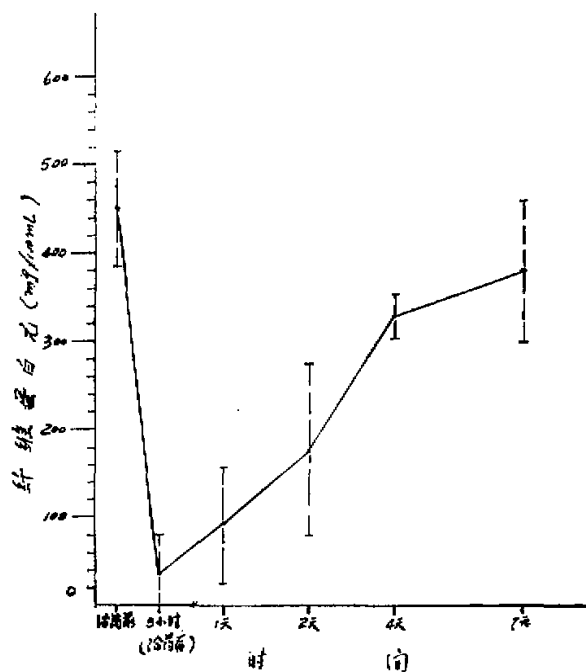


图4 去纤酶对家犬(每只给药剂量: 100微克/公斤, $n=5$)
血浆纤维蛋白元的作用。

参 考 文 献

- [1] Ouyang, C. et al., (1976) The effects of the purified thrombin-like and anticoagulant principles of *Aghistrodon acutus* venom on blood coagulation *in vivo*, *Toxicon*, 14(1), 49—54.
- [2] Ouyang, C. et al., (1978) *In vivo* effects of the purified thrombin-like and anticoagulant principles of *Aghistrodon acutus* (hundred-pace snake) venom, *Toxicon*, 16(6), 583—393.
- [3] Ouyang, C. et al., (1979) The clotting activity of the thrombin-like enzyme of *Aghistrodon acutus* (hundred-pace snake) venom, *Toxicon*, 17(3), 313—316.
- [4] Ashford, A. et al., (1968) Pharmacology and toxicology of a defibr-

ination substance from Malayan pit-viper venom, *Lancet*, 1:486—489

- [5] Gaffney, P. J. et al., (1974) Mode of action of ancrod as a defibrinating agent, *Nature*, 251(5470):53—54.

The Anticoagulant Function of Defibrase from *Agkistrodon acutus* venom in dogs

Zhang Hong-ji, Xiao Chang-hua, Xiong Yu-liang,
Ye Zhi-zhang, Cai Jing-xia, He Ji-zhi

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

Abstract

The experiments were carried out with the dosages of 5 μ g/kg, 25 μ g/kg and 100 μ g/kg on 15 dogs for the anticoagulant action of defibrase from *Agkistrodon acutus* venom.

The dogs were divided into three groups, 5 dogs per group. Defibrase could conspicuously decreased the plasma fibrinogen of the 15 dogs ($P < 0.01$). The decrease of fibrinogen induced marked anticoagulant effect. The sample of blood was taken 5 hours after administration of defibrase and kept at 37°C for 24 hours. The blood didn't coagulate. And the effect could last at least 24 hours. The spontaneous hemorrhagic complication and toxication were not observed. It showed that defibrase can play the anticoagulant role safely and distinctively.