

本文引用:范钊坤,秦甜,郑洁,曹泽标,周小青.蜘蛛丝蛋白促凝血作用及其机制的初步探讨[J].湖南中医药大学学报,2017,37(10):1052-1055.

蜘蛛丝蛋白促凝血作用及其机制的初步探讨

范钊坤¹,秦甜¹,郑洁¹,曹泽标¹,周小青^{2*}

(1.湖南中医药大学研究生院,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学中医诊断学科,中医诊断湖南省重点实验室,数字中医药协同创新中心,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 探索蜘蛛丝蛋白的促凝血作用,初步探讨其作用机制。**方法** 通过体外凝血实验(凝血板法、试管法、血浆复钙时间测定)及创面止血实验(以SD大鼠为研究对象,进行皮肤创面、肝脏创面、股动脉切开进行局部创面止血实验),比较蜘蛛丝蛋白组、云南白药组、生理盐水组各组的凝血时间及止血时间;并采用凝固法测定各组大鼠活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)和凝血酶时间(TT)。**结果** 与生理盐水组比较,蜘蛛丝蛋白组与云南白药组均能显著缩短大鼠体外凝血时间及大鼠皮肤创面、肝脏创面及股动脉切口的止血时间($P<0.01$ 或 $P<0.05$),且能缩短大鼠的APTT、PT和TT($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** 蜘蛛丝蛋白具有较明显的促凝血作用,激活内源性凝血系统和外源性凝血系统可能为其作用机制之一。

[关键词] 蜘蛛丝蛋白;促凝血试验;凝血时间;止血时间

[中图分类号]R285.5:Q51 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.010.002

Preliminary Discussion on Procoagulant Role and Mechanism of Spider Silk Protein

FAN Zhaokun¹, QIN Tian¹, ZHENG Jie¹, CAO Zebiao¹, ZHOU Xiaoqing^{2*}

(1. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Institute of Diagnostics of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine; Key Laboratory of Diagnostics of Chinese Medicine in Hunan province; Collaborative Center for Research and Innovation of Digital Chinese Medicine; Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the procoagulant role of spider silk protein and discuss its mechanism. **Methods** To compare the clotting time in vitro and hemostatic time of spider silk protein group, Yunnan Baiyao group and saline group through coagulation experiment conducted in vitro (coagulation method, tube method and recalcification time) and hemostatic experiment in wound surfaces (skin, liver, and femoral artery) in SD rats. Activated partial thromboplastin in time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT) were evaluated by solidification method in rats of each group. **Results** The clotting time in vitro and hemostatic time of spider silk protein group and Yunnan Baiyao group were obviously shortened compared with that of saline group ($P<0.01$ or $P<0.05$). Moreover, APTT, PT and TT were also obviously shortened compared with those of saline group ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** Spider silk protein shows obvious blood clotting effect. Activating endogenous coagulation and extrinsic coagulation may be one of its procoagulant mechanisms.

[Keywords] spider silk protein; procoagulant test; clotting time; hemostatic time

[收稿日期]2015-12-17

[基金项目]国家自然科学基金(81373702,81473567,81202632),教育部博士点基金(20124323120003),湖南省自然科学基金(13JJ3097),湖南省教育厅科研项目(14B134,15K092),湖南中医药大学研究生创新项目(2014cx04)。

[作者简介]范钊坤,男,在读硕士研究生,研究方向为脑血管病中西医结合防治。

[通讯作者]*周小青,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:zxq5381@sohu.com。

蜘蛛丝在民间作为医疗用品已经有很长的历史,《圣惠方》记载:“疗疮毒,止金疮血出。炒黄研末,酒服,治吐血”,也有《千金方》“蜘蛛膜贴疮上,数易之,瘥止”,可见其具有良好的凝血及促进伤口痊愈的功效,因此在现代医学方面有着广泛的运用。此外,蜘蛛丝还具有强度大、韧性好、可降解、与体的相容性好、无毒副作用等特点^[1],这也使得它具有极大的医学研究价值。特别是将蜘蛛丝用作高性能的生物医用材料,可制成伤口封闭材料和生理组织工程材料,如人工关节、韧带及组织修复等手术中的可降解超细伤口缝线等产品^[2]。蜘蛛丝是一种天然蛋白纤维,各个领域已经对其独特的理化性能、力学性能及超收缩性能等方面进行过深入研究^[3],而目前关于蜘蛛丝蛋白在凝血功效及机制探讨方面的研究尚少。本实验将研究蜘蛛丝蛋白的促凝血作用,并初步探讨其作用机制,以期开发出一种高效、便捷、安全、价廉的生物可吸收性止血产品提供新的实验理论基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级健康 SD 大鼠 30 只,体质量为 300~350 g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2011-0003,动物合格证号:NO.43004700015690。动物饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心,许可证号:SYXK(湘)2013-0005。用随机数字表法将大鼠随机分为生理盐水组、云南白药组和蜘蛛丝蛋白组,每组各 10 只,大鼠适应性喂养 7 d 后进行实验。

1.2 药品与试剂

蜘蛛丝蛋白(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所提供);1%戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司);真空枸橼酸钠(9:1)抗凝管;云南白药(云南省大理制药厂生产);秒表(深圳市良谊实验室仪器有限公司);APTT 试剂盒(货号 F008-1)、TT 试剂盒(货号 F009)、PT 试剂盒(货号 F007),均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 药物制备

将蜘蛛丝蛋白用 75%乙醇回流提取 3 次;合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,依次用等体积石油

醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取 3 次;合并萃取液,减压蒸馏得各提取部分干粉,待用。云南白药粉按相同的方法,得粗提物干粉,待用。

2 方法

2.1 体外凝血实验的观察

2.1.1 抗凝血液及抗凝血浆的制备 用一次性真空枸橼酸钠(9:1)抗凝管(血与抗凝剂按 9:1)自大鼠内眦球后静脉丛采血,轻轻混匀即成;抗凝血液经离心机离心制备,分离血浆时要求相对离心力 3 000 r/min,15 ℃离心 30 min,待测。

2.1.2 凝血时间测定 将蜘蛛丝蛋白、云南白药粉粗提物溶于生理盐水配制成 0.5%浓度,经一次性进口滤器抽滤成清亮、不同色泽的提取液,用此溶液进行凝血时间(凝血板法、试管法、血浆复钙时间)的测定。以云南白药组为阳性对照组,并设生理盐水阴性对照组。凝血时间缩短率=(对照组血凝时间-给药组血凝时间)/对照组血凝时间×100%,一般以药物凝血时间比对照组缩短 30%以上者认为有效。

2.2 局部创面止血试验

2.2.1 药液及辅料的制备 将蜘蛛丝蛋白、云南白药粗提物用生理盐水溶解配制成 2%浓度;体表创面止血用 2 cm×2 cm 浸有药液纱布两层;肝脏创面止血用 1.5 cm×1.5 cm 浸有药液纱布两层;股动脉切开止血用 2 cm×2 cm 浸有药液纱布四层。

2.2.2 止血时间测定 将各组大鼠用 1%戊巴比妥钠按 30 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉后,备皮,在无菌条件下分别进行皮肤创面(在大鼠背部左右两侧制造 1.5 cm×1.5 cm 大小的出血创面)、肝脏创面(开腹,暴露肝脏,并在肝表面切开大小 1 cm×0.5 cm,深 3 cm 大小肝组织,造成出血创面)、股动脉切开(钝性分离暴露两侧股动脉,横剪血管周径 1/3 左右切口)进行局部创面止血实验,擦拭去喷出的血液后,分别在出血创面平铺蜘蛛丝蛋白纱布、云南白药纱布、生理盐水纱布,约 30 s 左右揭开纱布观察出血情况,以后每隔 30 s 观察 1 次,观察指标以不出血为止,记录止血时间,观察止血效果,计算其平均止血时间。

2.3 凝血指标测定

各组大鼠用 1%戊巴比妥钠按 30 mg/kg 剂量

腹腔注射麻醉,10 min后腹主动脉取血,置于一次性真空枸橼酸钠(9:1)抗凝管中,轻轻颠倒混匀,3 000 r/min,离心30 min,收集上清液,即待测血浆。取待测血浆按照蜘蛛丝蛋白组、云南白药组加入样品,生理盐水组则加入生理盐水,混匀,37℃水浴预温后按照各试剂盒的要求分别进行活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)和凝血酶时间(TT)的测定。

2.4 统计学方法

所有数据运用SPSS 19.0统计软件包进行单因

素方差分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间两两比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体外凝血实验的观察

与生理盐水组相比,蜘蛛丝蛋白组及云南白药组均能显著缩短体外凝血时间($P<0.01$),但蜘蛛丝蛋白组与云南白药组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。表中亦可见蜘蛛丝蛋白组凝血时间缩短率在30%以上,表明蜘蛛丝蛋白有明显促凝血作用。见表1。

表1 蜘蛛丝蛋白对大鼠体外凝血时间的影响

($\bar{x}\pm s, n=10, s$)

组别	凝血板法	试管法	血浆复钙时间(RT)	凝血时间缩短率/%
生理盐水组	250.45±40.01	290.15±57.66	200.45±35.81	-
云南白药组	87.56±12.72**	101.45±15.34**	70.34±19.48**	65.69±3.34
蜘蛛丝蛋白组	75.02±13.45**	85.87±18.01**	60.07±15.36**	70.68±2.96

注:与生理盐水组比较,** $P<0.01$ 。

3.2 创面止血试验

与生理盐水组相比,蜘蛛丝蛋白组及云南白药组均能显著缩短大鼠皮肤创面、肝脏创面及股动脉切口的止血时间($P<0.01$ 或 $P<0.05$),且蜘蛛丝蛋白组与云南白药组之间差异无统计学意义($P>0.05$),说明蜘蛛丝蛋白有良好的创面止血作用。见表2。

表2 蜘蛛丝蛋白对大鼠局部创面的止血作用 ($\bar{x}\pm s, n=10, s$)

组别	止血时间		
	皮肤创面	肝脏创面	股动脉切口
生理盐水组	90.11±20.88	96.32±16.73	104.37±19.22
云南白药组	54.53±9.27**	62.57±10.69**	74.46±11.43*
蜘蛛丝蛋白组	45.12±11.29**	57.89±14.36**	61.07±15.58*

注:与生理盐水组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.3 凝血功能试验(APTT,PT,TT测定)

与生理盐水组相比,蜘蛛丝蛋白组及云南白药组均能够显著缩短大鼠的APTT、PT和TT($P<0.01$ 或 $P<0.05$),但蜘蛛丝蛋白组及云南白药组两组之间差异无统计学意义($P>0.05$),提示蜘蛛丝蛋白促凝血作用可能是通过内源性凝血途径和外源性凝血途径共同起作用的。见表3。

4 讨论

蜘蛛丝治出血,古籍中早有记载,如《退斋闲录》

表3 蜘蛛丝蛋白对大鼠APTT、PT和TT的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10, s$)

组别	APTT	PT	TT
生理盐水组	52.81±8.05	18.95±3.64	30.11±4.92
云南白药组	48.11±5.42*	12.61±3.14**	27.11±4.01*
蜘蛛丝蛋白组	41.11±7.84**	10.58±2.09**	22.11±3.82**

注:与生理盐水组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

云:“凡人卒暴吐血者,用大蜘蛛网搓成小团,米饮吞下,一服立止”,可见蜘蛛丝作为止血之物的历史由来已久。《中华本草》上也有记载蜘蛛网粉能明显缩短家兔凝血时间,且与剂量呈正相关。本实验研究显示:在体外凝血实验及局部创面止血试验中,与生理盐水组比较,蜘蛛丝蛋白组与云南白药组均能显著缩短大鼠体外凝血时间及大鼠皮肤创面、肝脏创面及股动脉切口的止血时间($P<0.01$ 或 $P<0.05$),且凝血时间缩短率大于30%,证明蜘蛛丝蛋白确实具有良好的促凝血作用,促凝效果与云南白药阳性对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。现代生物研究表明蜘蛛丝是具有多级结构的蛋白质纤维^[4],因其特殊的蛋白质结构使得它能够起到类似血小板的凝血作用,同时蜘蛛丝这种细的纤维具有良好的止血作用并可促进伤口痊愈,在伤口包覆材料方面诸如尿管伤口修复材料、止血敷料、止血片、止血胶和缝合线等获得了广泛的应用^[5]。面对现代医学中现有止血

材料的种种弊端,例如临床运用最广泛的可吸收性明胶海绵易继发感染、黏附性差,且组织排异反应大;胶原蛋白类材料止血速度慢、创面组织附着力差、容易破裂等^[6],因此开发止血效果更佳、更适用于临床的新型止血材料势在必行。目前中医药研究止血方较多,如胶艾汤^[7]等,但蜘蛛丝蛋白无疑是具有极大研究价值及开发前景的止血材料选择,因此本实验对蜘蛛丝蛋白的促凝血作用及机制探讨的研究将为以后开发更佳的止血生物制品提供重要的借鉴意义。

目前公认凝血过程是一个由多因子共同参与的复杂过程,主要分为“内源性凝血途径”和“外源性凝血途径”^[7]。前者是由血管内膜损伤激活所引发,后者则通过血管外的凝血因子与血液接触而启动。本实验测定的三个凝血功能指标中,APTT 主要反映内源性凝血系统状况,PT 主要反映外源性凝血系统状况,TT 则主要反映纤维蛋白原转为纤维蛋白所需时间及内、外源凝血途径是否存在抗凝和纤溶亢进^[8],通过测定此三项指标,可以检测实验样品是否通过激活凝血系统中的多种凝血因子起作用。在该凝血功能测定中,蜘蛛丝蛋白组及云南白药组均能够显著地缩短大鼠的 APTT、PT 和 TT($P<0.01$ 或 $P<0.05$),说明蜘蛛丝蛋白促凝血作用机制可能是通过内源性凝血途径和外源性凝血途径共同起作用的,即对内源性和外源性凝血途径的多种凝血因子具有激活作用。

总之,本实验研究表明蜘蛛丝蛋白具有明显的促凝血作用,初步探讨其作用机制可能与激活内、外源性凝血系统中的多种凝血因子有关系,但是其对各凝血因子的具体影响程度方面还需要进一步的研究,因此更深层次的机制还有待深入探讨。

参考文献:

- [1] 袁凤辉,白涛,曹波,等.蜘蛛的药用价值研究概况[J].时珍国医国药,2008,19(2):282-284.
- [2] T.Scheibel,喻盈捷.蜘蛛丝:从天然到生物启发的材料[J].国际纺织导报,2011,39(2):7-8.
- [3] 杜文华,赵天福,朱勇.蜘蛛丝蛋白基因工程的研究进展[J].蚕业科学,2011,37(5):892-898.
- [4] 肖森波,陈健,Frauke Graeter.计算机模拟和 X-射线实验研究蛋白质机械力学[J].生命科学,2009,21(1):21-27.
- [5] 潘鸿春,宋大祥,周开亚.蜘蛛丝蛋白研究进展[J].蛛形学报,2006,15(1):52-59.
- [6] 王晨.生物功能材料在止血方面的应用[J].明胶科学与技术,2014,34(4):168-174.
- [7] 蒋晓煌,蒋孟良,贺卫和,等.胶艾汤不同炮制组方对动物激素水平与凝血机制的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(6):591-593.
- [8] 钟海利,郑志燕,廖细平,等.六月雪水提取物促凝血作用及机制的研究[J].中国当代医药,2014,21(15):11-13.
- [9] 苏敏,梁慧超,孟江,等.姜炭对虚寒性出血证大鼠凝血功能,血栓素 B2 和 6-酮-前列腺素 F1 α 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(9):190-193.

(本文编辑 李杰)