

Study on the Thrombolytic Components of *Brevibacillus parabrevis* Strain with Name of GYZC01

Dan Jiang¹, Xinxin Wang¹, Gang Yang¹, Qin Zhao¹, Xun Zhu¹,
Jian Zhan², Zaichang Yang^{1*}

¹School of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang Guizhou

²Guizhou Xiu Wine Group Co., Ltd, Xishui Guizhou

Email: yangzaichang@126.com

Received: May 9th, 2017; accepted: May 22nd, 2017; published: May 25th, 2017

Abstract

Thrombotic disorders have been emerged to be the main causes of human mortality. Now microbes are one of the main sources of antithrombotic drugs. Therefore, it is of great value to find safe and effective new type of thrombolytic drugs from microbial fermentation products. In this study, the thrombolytic components and *in vivo* thrombolytic activity of the fermentation products of *Brevibacillus parabrevis* YZC01 were performed by us based on chemical methods and mice models respectively. The results showed that the crude extract of the fermentation products of YZC01 contained cyclic peptide with glycosylation structure. In mice tail bleeding time test, the extract has prolonged bleeding time in mice at dosage of 10 mg/ml. However, in *in vitro* assay, the activity of antiplatelet agglutination of the extract was not significant. It is indicated that the thrombolytic activity of the GYZC01 extract can be linked to blocking the coagulation factor receptor.

Keywords

Brevibacillus parabrevis, YZC01 Strain, Thrombolytic Activity, Active Components

类短短芽孢杆菌GYZC01菌株溶血栓的活性成分研究

江 丹¹, 王星星¹, 杨 刚¹, 赵 琴¹, 朱 勋¹, 张 健², 杨再昌^{1*}

¹贵州大学药学院, 贵州 贵阳

²贵州习酒集团有限公司, 贵州 习水

*通讯作者。

文章引用: 江丹, 王星星, 杨刚, 赵琴, 朱勋, 张健, 杨再昌. 类短短芽孢杆菌 GYZC01 菌株溶血栓的活性成分研究[J]. 药物化学, 2017, 5(2): 24-29. <https://doi.org/10.12677/hjmce.2017.52004>

Email: yangzaichang@126.com

收稿日期: 2017年5月9日; 录用日期: 2017年5月22日; 发布日期: 2017年5月25日

摘要

血栓性疾病已成为人类疾病死亡的主要原因, 微生物是抗血栓药物的主要来源之一, 从微生物发酵产物中发现安全有效的新型溶血栓药物具有重要价值。本试验分别采用化学方法和小鼠模型, 研究了类短短芽孢杆菌YZC01株发酵产物的溶血栓组分和体内溶血栓活性。结果表明YZC01株发酵产物溶血栓活性组分含糖基环肽类化合物, 当剂量为10 mg/kg时, 溶血栓活性组分具有延长小鼠断尾出血时间和溶血栓作用, 但是体外抗血小板凝集的活性并不明显, 推测其作用机制与阻断凝血因子受体有关。

关键词

类短短芽孢杆菌, YZC01菌株, 溶血栓, 活性成分

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

近年来血栓性疾病呈现上升趋势, 对人类健康构成重大威胁。因此发现新型抗血栓药物成为研究热点。近年来从微生物中寻找溶血栓药物逐渐受到重视, 已经发现一些放线菌、真菌、和细菌具有溶血栓的作用[1] [2]。我们对部分土壤细菌进行过溶血栓试验, 发现类短短芽孢杆菌 GYZC01 株具有溶血栓活性, 体外试验表明, 该菌株能产生一种金属蛋白酶, 直接溶解血栓[3]。在后续试验中, 我们将培养液经酸处理, 在 80℃ 条件下蒸干, 待蛋白酶活性完全被破坏后, 得到的物质同样显示出良好的体内溶血栓和抗血栓形成活性, 经活性跟踪, 初步明确其活性产物为糖肽类化合物, 报道如下。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌株来源

实验室筛选保存的细菌 GYZC01 株。

2.1.2. 试剂

蛋白胨、牛肉浸膏、NaCl、琼脂粉、石油醚、乙酸乙酯、氯仿、乙醇等均为分析纯。

2.1.3. 实验动物

昆明鼠(购自贵州医科大学实验动物中心)。

2.2. 液体发酵及发酵液处理

液体培养基由蛋白胨 2 g、牛肉浸膏 1 g、NaCl 0.5 g、蒸馏水 100 ml 组成, 调 pH 为 7.0, 灭菌后冷却, 接种 GYZC01 菌株, 置 35℃ 摇床(120 r/min)中培养 72 h, 发酵液离心除去菌体, 取上清液转入烧杯,

逐滴加入 10% 的 HCl, 用 pH 酸度计随时测量 pH 值的变化, 当 pH 值为 2 时, 发现有沉淀物开始出现, 停止滴加 HCl, 然后将液体放置在 4℃ 的冰箱中静置 24 h, 收集沉淀物, 并将所得沉淀物在 80℃ 干燥, 将所得干燥物加入二氯甲烷中, 在磁力搅拌器上搅拌萃取 12 h, 过滤收集滤液, 用旋转蒸发仪除去二氯甲烷, 即得抗血栓活性物质粗品。

2.3. 溶血栓物质薄层色谱分析

称取 GYZC01 抗血栓活性物质粗品 1 mg, 溶解在 1 ml 的二氯甲烷中, 用毛细管吸取样本溶液在薄层硅胶板上点样, 展开剂为二氯甲烷/甲醇/水(45/5/2, v/v/v)。显色剂为: ① 苯酚-硫酸试剂; ② 0.5% 茚三酮丙酮溶液。

2.4. 溶血栓物质红外光谱分析

取抗血栓活性物质适量, 采用 KBr 压片法测定红外吸收光谱(FT-IR 670 型红外光谱仪), 扫描范围 4000~400 cm^{-1} 。

2.5. 小鼠断尾出血时间测定

昆明鼠(28 g)取 30 只分为 2 组, 治疗组: 10 只, 用生理盐水配制样本母液, 按 10 mg/kg 的剂量, 每只小鼠灌胃 0.2 ml, 每日灌药一次, 用药 5 天后测定小鼠断尾出血时间; 阴性对照组: 10 只, 灌等体积的生理盐水。阳性对照: 10 只, 阿司匹林, 按 10 mg/kg 的剂量, 每只小鼠灌胃 0.2 ml, 每日灌药一次。按文献方法测定小鼠断尾出血时间[4]。

2.6. 小鼠体内溶血栓试验

采用小鼠角叉菜胶尾动脉血栓模型评价溶血栓活性[5]。取 80 只小鼠, 每只小鼠腹腔注射 0.2% 的角叉菜胶 0.5 ml 制造血栓黑尾模型, 48 h 后选出所有黑尾小鼠, 没有发生黑尾的淘汰。造模成功的小鼠随机分组, 治疗组(10 只): 用生理盐水配制样本母液, 按 10 mg/kg 的剂量, 每只小鼠灌胃 0.2 ml, 每日灌药一次; 尿激酶组(10 只): 尿激酶用生理盐水配成 10^5 U/ml, 每只小鼠腹腔注射 0.2 ml, 每日一次; 阿司匹林组: 按 10 mg/kg 的剂量, 每只小鼠灌胃 0.2 ml; 模型对照组(10 只): 灌生理盐水 0.2 ml。连续给药 5 天后, 分别测量小鼠的黑尾长度。

2.7. 抗血小板聚集试验

以 3.8% 枸橼酸钠抗凝, 室温下 800 r/min 离心 10 min, 分离富血小板血浆(PRP)。将余血再以 3000 r/min 离心 10 min, 得贫血小板血浆(PPP), 用 PPP 调整 PRP, 使血小板数约为 $250 \times 10^9/\text{L}$ 。取 PRP 250 μL , 分别加入 0.9% 氯化钠溶液(阴性对照)及不同浓度的样本 10 μL , 阿司匹林为阳性对照, 37℃ 在血小板聚集仪上搅拌, 孵育 5 min 后加入诱聚剂 ADP 10 μL (ADP 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$), 同时开始测定。采用比浊法测定血小板聚集率, 测定时间为 5 min。记录血小板最大聚集率, 按公式计算血小板聚集抑制率: 血小板聚集抑制率% = (阴性组聚集率 - 给药组聚集率) / 阴性组聚集率 $\times 100\%$ 。

3. 结果

GYZC01 抗栓活性物质经硅胶薄层层析, 苯酚 - 硫酸试剂显色后, 呈橙黄色斑点, 经 0.5% 茚三酮丙酮溶液染色后, 显紫色斑点, 故该物质属于糖肽类化合物(图 1)。红外光谱显示, 3422 cm^{-1} 波段有吸收峰, 表明分子中有大量羟基存在, 2925~2854 cm^{-1} 波段吸收峰是糖类大量 C-H 的伸缩振动, 1653~1548 cm^{-1} 吸收峰是 C=O 的震动, 1080 cm^{-1} 为 C-O-C 键的伸缩振动吸收峰(图 2), 这些吸收峰与文献报道的

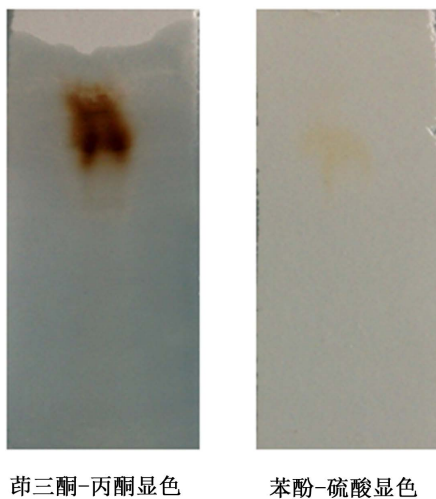


Figure 1. TLC analysis
图 1. 薄层色谱分析

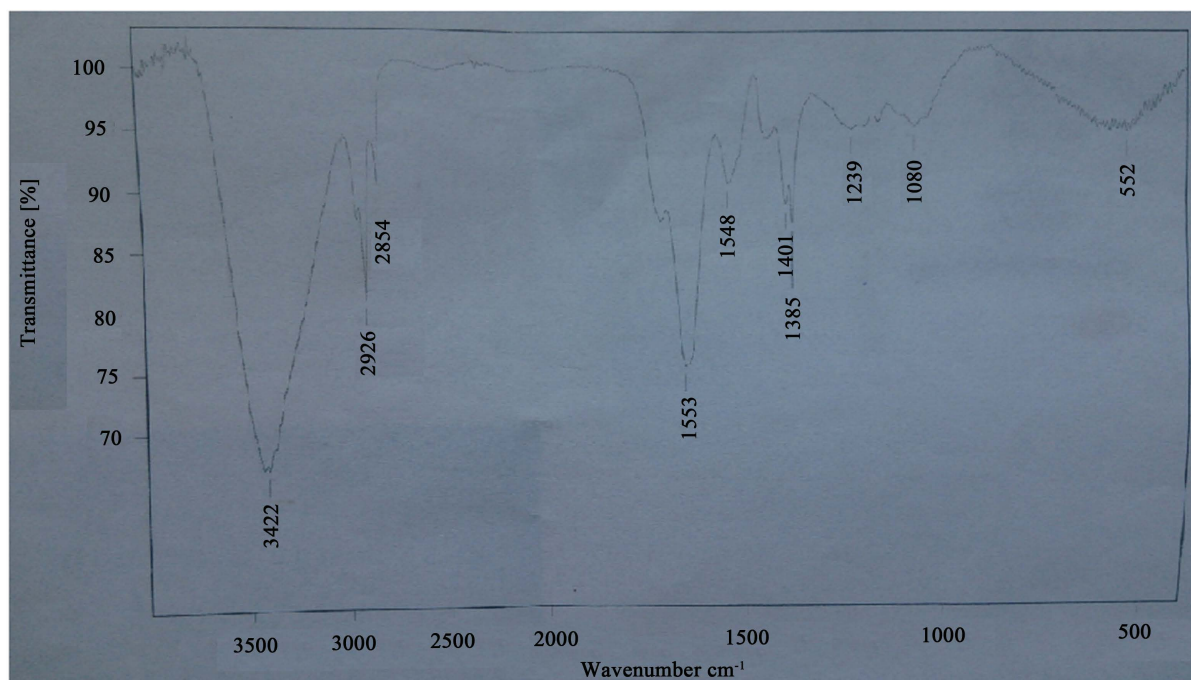


Figure 2. Infrared spectrum of thrombolytic composition extracted from GYZC01
图 2. GYZC01 溶血栓组分红外光谱图

相近[6], 说明该产物中有糖苷键和环状内酯存在。根据上述结果, GYZC01 株抗栓活性物质可能为一种糖基环肽类化合物。

给药后, GYZC01 抗栓活性物质能使小鼠断尾出血时间延长, 效果超过阿司匹林(表 1)。

体内溶血栓试验表明, GYZC01 抗栓活性物质具有溶血栓效果, 但是不如阳性药尿激酶明显(表 2)。模型对照组血栓长度明显增加, 阿司匹林无溶血栓作用。

从表 3 看出 GYZC01 抗栓活性物质能抑制血小板聚集, 呈明显的量效关系, 但总体较弱, 明显达不到阳性药的水平。

Table 1. Tail bleeding time
表 1. 断尾出血时间

组别	N	出血时间(min)
YZC01治疗组	10	11.9 ± 1.4 [#]
阴性对照组	10	4.4 ± 0.6
阳性对照组	10	8.7 ± 1.2 [#]

[#]与阴性对照组比较, $P < 0.005$ 。

Table 2. Thrombolytic assay in mice
表 2. 小鼠溶栓试验

组别	N	血栓长度(cm)	
		给药前	给药后
YZC01治疗组	10	2.4 ± 0.4	1.8 ± 0.2 [#]
尿激酶	10	2.3 ± 0.6	1.2 ± 0.1 [#]
阿司匹林组	10	2.4 ± 0.7	3.4 ± 0.3
模型对照组	10	2.3 ± 0.6	3.6 ± 0.7

[#]与模型对照组比较, $P < 0.005$ 。

Table 3. Anti-platelet aggregation test
表 3. 抗血小板聚集试验

药物	浓度(μg/ml)	最大聚集率(%)	抑制率/%
阴性对照	0	47.4 ± 4.2	0%
	16	44.1 ± 2.4	6%
GYZC02 提取物	32	36.8 ± 3.1	23%
	64	28.4 ± 2.6	40%
阳性药组	32	8.2 ± 1.7	83%

4. 讨论

溶栓药物是指可以直接溶解血栓或间接激活纤溶酶原的一类药物,能使血管的血流再次畅通。链激酶是来自 β -溶血性链球菌的溶栓药物,也是第一个用于血栓治疗的药物,近十几年来,已经从不同的微生物发现了一些具有溶栓活性的蛋白酶,但是对来源于微生物具有溶栓活性的非蛋白类分子或分子量较小的肽类分子的溶血栓活性未被重视。我们的实验证实,类短短芽孢杆菌 YZC01 株发酵液经蛋白破坏处理后仍然具有体内溶血栓活性。

对发酵液进行处理得到具有溶栓作用的粗产物,经薄层色谱显色、红外光谱表征,初步判断活性组分中含糖基环肽类化合物,这类化合物是否就是溶血栓活性物质尚不能确定,有待进一步研究,相关工作正在进行中。

GYZC01 菌株抗栓活性物质能延长小鼠断尾出血时间,表明活性物质对血凝系统有抑制作用,体外血小板凝集抑制试验提示,该活性物质对血小板功能的干预并不强,我们推测其抗凝血作用与阻断凝血因子的相关受体有关。腹腔注射角叉菜胶导致小鼠尾部出现血栓,该模型具有简便、易行、价廉的特点,其机制与血管内皮炎症因子激活外源性凝血系统有关。治疗试验显示尿激酶能明显清除血栓,阿司匹林

无效, GYZC01 菌株抗栓活性物质同样能溶解小鼠尾部血栓, 可以推测该活性物质是纤溶酶原激活剂。由于 GYZC01 菌株抗栓活性物质产率较低, 我们拟通过优化发酵条件以获得更多产物, 才能进行进一步的分离纯化研究。现有纤溶酶原激活剂大多数是蛋白类大分子, 存在制剂条件要求高、储存运输要求高、不能口服等缺点, 因此, 发现小分子类纤溶酶原激活剂对研发新型溶栓药物具有重要意义。

基金项目

贵州省社会发展科技攻关项目(SY 字[2013]3058 号), 贵大(国)创字 20(022), 国家自然科学基金(81460531)。

参考文献 (References)

- [1] Kim, W., Choi, K., Kim, Y., *et al.* (1996) Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus*. Strain CK 11-4 Screened from Chungkook-Jang. *Applied & Environmental Microbiology*, **62**, 2482-2488.
- [2] Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., *et al.* (1993) Purification and Characterization of a Strong Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto, a Popular Soybean Fermented Food in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **197**, 1340-1347. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2624>
- [3] Yang, Z., Du, R., Le, Y., *et al.* (2012) Crude Fibrinolytic Enzyme from Newly Isolated Soil Bacterium *Brevibacillus Parabrevis* Strain GYZC01: Preliminary Study. *International Journal of Integrative Biology*, **13**, 30-35.
- [4] Strassel, C., Nonne, C., Eckly, A., *et al.* (2007) Decreased Thrombotic Tendency in Mouse Models of the Bernard-Soulier Syndrome. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **27**, 241-247. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000251992.47053.75>
- [5] 魏陵博, 戎冬梅, 吉中强, 等. 角叉菜胶致大鼠尾部血栓形成的机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(5): 542-543.
- [6] Ang, Y., Luo, Y., Liu, W., *et al.* (2009) Screening and Primary Optimizing of Cultural Medium of Biosurfactant Producing Strain. *Sciences of Soils*, **41**, 243-247.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjmce@hanspub.org