

纤溶豆豉的制备及其对小鼠溶栓效果的评价

李小东, 王成涛*, 赵磊, 杨雪莲, 张佳婵

(北京工商大学 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 食品风味化学北京市重点实验室, 北京 100048)

摘要: 利用动物血栓模型, 饲喂纤溶豆豉来研究其在动物体内的溶栓作用。通过小鼠腰背部皮下注射 10mg/mL 角叉菜胶溶液诱发小鼠尾静脉形成血栓, 实验组 A 饲喂豆豉纤溶豆豉并自由饮用纤溶豆豉提取液, 对照组 B(模型小鼠)、对照组 C(正常小鼠)分别饲喂全价营养鼠粮, 并自由饮水。结果表明: 各组小鼠生长情况良好; 饲喂纤溶豆豉的实验组 A 小鼠体质量先降低后增高, 饲喂 5d 以后尾部形成的血栓长度逐渐变短, 10d 时凝血酶原时间、凝血酶时间稍有延长, 但差异不显著, 15d 后凝血酶原时间、凝血酶时间均明显延长($P < 0.05$), 血浆中纤维蛋白原(FIB)含量相应降低, D-二聚体在饲喂 10d 后呈阳性; 而饲喂全价营养鼠粮的对照组 B 及注射生理盐水的对照组 C, 其 PT、TT 差异均不显著。因此食用纤溶豆豉能激活机体纤溶系统, 抑制凝血系统作用, 有助于预防和辅助治疗血栓性疾病。

关键词: 中国豆豉; 小鼠血栓模型; 血栓长度; 纤溶活性; 角叉菜胶

Preparation of Fibrinolytic Douchi and Evaluation of Its Thrombolytic Effectiveness *in vivo*

LI Xiao-dong, WANG Cheng-tao*, ZHAO Lei, YANG Xue-lian, ZHANG Jia-chan

(Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: The effect of feeding Douchi was evaluated on mouse thrombosis induced by subcutaneous injection with 10 mg/mL carrageenan at the back waist of mice. ICR mice were divided into three groups: Douchi treatment group (thrombosis model mice fed Douchi and normal saline extract from Douchi), model control group (thrombosis model mice fed full nutrition diet and distilled water) and normal control group (normal mice fed full nutrition diet and distilled water). The results showed that the mice in the Douchi treatment group exhibited an initial decrease and subsequent increase in body weight, a slight increase in prothrombin time (PT) and thrombin time (TT), and a reduction in plasma fibrinogen (FIB) during the experiment. The detection of D-dimer was positive after 10 days of feeding and PT and TT were notably prolonged ($P < 0.05$) in the mice fed for 15 days. However, PT and TT showed no significant difference between the model control group and normal control group. Therefore, Douchi can activate the function of fibrinolysis, inhibit the function of blood-clotting system, and prevent and treat thrombosis diseases.

Key words: Chinese Douchi; thrombosis model; length of infarcted regions; fibrinolytic activity; carrageenan

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0228-04

豆豉是我国的传统发酵食品, 营养丰富、风味独特, 并且具有开胃增加食欲及预防心脑血管疾病的功效^[1]。近年来, 我国研究人员对豆豉进行了研究, Wang Chentao 等^[2]从山东八宝豆豉中分离到一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* DC12-33), 能产生具有溶解血栓作用的豆豉纤溶酶 Subtilisin FS33(30kD), 并发现其在体内和体外均具有明显的降解血栓纤维蛋白的能力。

张炳文等^[3]也发现豆豉激酶对角叉菜胶造成的小鼠血栓形成呈现一定的剂量效应, 说明豆豉激酶对血栓形成具有预防作用。

食品功能因子需要借助胃肠道吸收, 口服也是最易接受和方便的给药途径。近年来一些肽类、蛋白质类、抗原类等大分子物质, 通过选择合适的载体材料和制备工艺, 可防止其被胃肠道酸和酶的破坏, 提高其生物

收稿日期: 2011-08-02

基金项目: 北京市属高校人才强教计划项目(PHR201008237); 教育部-北京市教委科研重点项目(KM201110011001); 学科与研究生教育-食品学科特色学科群建设项目(PXM2011-014213-113634)

作者简介: 李小东(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: xiaodongwenni@163.com

*通信作者: 王成涛(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wct5566@163.com

利用度。关于蛋白质(酶)、多肽能否通过肠道完整吸收,一直未有定论或存在争议。现在已发现至少有5种小肽类转运系统: PepT1、PepT2、HPT-1、HPT-2、PTR 家族^[4-5]。Lee 等^[6]研究发现从安德爱胜蚓中纯化得到的蚓激酶 SPP-501(30kD)通过口服吸收后仍具有抗血栓作用和纤溶活性。Capraro 等^[7]用蛋白免疫印记法发现未经修饰的蓝豆蛋白(68kD 糖蛋白)在大鼠小肠和 Caco-2 细胞模型中均有吸收,吸收后仍有活性。Wood 等^[8]研究发现用水凝胶包裹的胰岛素在 Caco-2 和 HT29 MTX 肠上皮细胞模型上有吸收作用。贺华君等^[9]研究荧光标记 SOD (16kD)的完整吸收,也认为 SOD 分子可穿越细胞膜进入细胞。本课题组已实验证明豆豉纤溶酶经静脉注射的溶栓效果,该酶既能激活无活性的纤溶酶原转化为活性纤溶酶,也能直接降解血栓纤维蛋白,表现出良好的溶栓性^[2,10]和蛋白水解活性^[11]。本实验探讨口服纤溶豆豉对动物血栓模型的溶栓效果,以期对豆豉保健品和新型溶栓剂开发提供技术参数和指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物

ICR 小鼠(24 只,雄性,体质量 (30 ± 2) g)、全价营养鼠粮均有北京大学医学部实验动物中心提供;垫料经高温灭菌,定期更换以保持动物的清洁和干爽;空调控制实验室温度为 22~24℃,空气相对湿度控制在 $(60 \pm 6)\%$,室内照明以自然采光为主,环境较安静。

1.2 材料与试剂

角叉菜胶(Type I) 美国 Sigma 公司;八宝豆豉山东临沂惟一斋酱园。

柠檬酸钠、纤维蛋白原、凝血酶(酶活力 190Bp)中国食品药品检定研究所;凝血酶原时间(PT)测试试剂盒、凝血酶时间(TT)测试试剂盒 北京世帝科学仪器公司;溶栓二聚体(D-dimer)乳胶诊断试剂盒 上海捷门生物技术公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株的鉴定

从山东八宝豆豉中分离筛选的高产纤溶酶菌株,初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* DC₁₂₋₃₃)^[2]。

1.3.2 纤溶豆豉及其浸提液的制备

挑选完整无病虫害的黄豆,清洗、浸泡过夜,蒸煮 1h,分装与 500mL 罐头瓶中冷却至室温,以体积分数 8% 的接种量接入 *B. subtilis* DC₁₂₋₃₃ 种子培养液,8 层纱布扎口,35℃ 发酵 48h 后于 4℃ 冷藏。将发酵豆豉分别加入 1.5 倍体积生理盐水浸提 2 次(3h/次),合并浸提液,8 层纱布过滤得豆豉浸提液。

1.3.3 纤溶酶活力测定

采用改进的纤维蛋白平板法。在直径 9cm 培养皿中分别加入 8mL 牛血纤维蛋白原液(约 20mg 纤维蛋白原)、5mL 0.1mol/L 巴比妥缓冲液(pH7.8)、8mL 的 10mg/mL 琼脂糖和 0.65mL 的牛凝血酶溶液(约 0.65Bp 的凝血酶),混合均匀,室温放置 1h,平板凝固后即富纤溶酶原纤维蛋白平板。10 μ L 酶液小心滴加在富纤溶酶原纤维蛋白平板,于 37℃ 孵育 18h,透明圈的大小表示纤溶酶活力,同时以尿激酶作为对照,制备标准曲线。

1.3.4 小鼠血栓模型的建立

参考胡三觉等^[12]报道的制造小鼠血栓模型方法,略有改动。用乙醚将 ICR 小鼠轻微麻醉,用 70% 乙醇在腰背部消毒,以 100mg/kg 的剂量腰背部皮下注射 10mg/mL 角叉菜胶溶液(称取一定量的角叉菜胶(研磨辅助溶解),用生理盐水溶解配制成 10mg/mL 角叉菜胶溶液(现配现用)),注射完成后将小鼠置于温度低于 18℃ 的环境中饲养,注意观察小鼠尾巴变化。小鼠尾尖在 4~24h 期间出现暗红色血栓形成区,并逐渐向尾根部扩大,48h 后变紫黑色,与正常尾部分界明显。

1.3.5 实验设计及分组

将尾巴形成暗红色血栓的 16 只小鼠随机分为 2 组:实验组 A 和对照组 B,每组 8 只;腰背部皮下注射生理盐水的 ICR 小鼠为对照组 C(8 只)。实验过程中,实验组 A 模型小鼠饲喂自制豆豉,并饮用豆豉浸提液;对照组 B 和对照组 C 饲喂全价营养鼠粮,并饮用蒸馏水。3 组小鼠分别于饲喂 5、10、15d 后眼眶静脉丛采血 0.3mL (血液与 38mg/mL 柠檬酸钠按体积比 9:1 抗凝),3000r/min 离心 10min,收集血浆置入 -80℃ 冰箱保存待测。

1.3.6 小鼠血栓相对长度的计算

用游标卡尺分别在饲喂纤溶豆豉后 0、5、10、15d 测量实验组 A 和对照组 B 小鼠的血栓形成长度,并且按照 $L = L_1/L_2$ 计算小鼠血栓形成相对长度,其中, L 表示血栓形成相对长度, L_1 表示血栓形成长度, L_2 表示小鼠尾巴总长度。

1.3.7 指标测定

凝血酶原时间、凝血酶时间、D-二聚体分别采用试剂盒检测;纤维蛋白原(FIB)含量测定采用双缩脲法检测^[13]。

1.4 数据处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 纤溶豆豉制备及纤溶酶活力

按照 1.3.2 节方法制备纤溶豆豉,夹起豆粒有较长

表2 纤溶豆豉对凝血酶原时间、凝血酶时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 2 Effect of fibrinolytic Douchi on PT and TT of mice($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	凝血酶原时间/s			凝血酶时间/s		
	5d	10d	15d	5d	10d	15d
实验组 A	13.67 $\pm$ 1.03	13.83 $\pm$ 1.47	16.83 $\pm$ 1.47 ^b	36.17 $\pm$ 4.75	36.00 $\pm$ 5.18	37.67 $\pm$ 5.72 ^a
对照组 B	13.33 $\pm$ 1.75	13.17 $\pm$ 0.98	12.83 $\pm$ 0.75	33.33 $\pm$ 3.78	30.67 $\pm$ 3.27	29.17 $\pm$ 2.64
对照组 C	12.50 $\pm$ 0.55	12.67 $\pm$ 0.82	12.67 $\pm$ 0.82	36.83 $\pm$ 3.37	36.50 $\pm$ 2.88	36.67 $\pm$ 0.82

的细丝,食用后豆豉特征风味明显。将此发酵豆豉的浸提液用纤维蛋白平板法测定其纤溶酶活力,浸提液酶活力为418300U/L。

2.2 饲喂纤溶豆豉对小鼠体质量和生长情况的影响

每天观察小鼠饮水、饮食、行为活动等有无异常,分别于实验5、10、15d称小鼠体质量,以观察小鼠的生长情况,各组小鼠生长良好,无一意外死亡,结果如表1所示。

表1 纤溶豆豉对小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 1 Effect of fibrinolytic Douchi on body weight of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	体质量/g			
	0d	5d	10d	15d
实验组 A	30.18 $\pm$ 1.13 ^a	29.25 $\pm$ 1.58 ^a	27.76 $\pm$ 1.56 ^a	29.74 $\pm$ 2.88 ^a
对照组 B	29.88 $\pm$ 1.56	29.67 $\pm$ 1.55	31.48 $\pm$ 2.40	32.61 $\pm$ 3.80
对照组 C	31.88 $\pm$ 1.25	29.39 $\pm$ 1.43	31.91 $\pm$ 1.94	34.54 $\pm$ 2.58

注: a. 对照组 B 比较, 差异显著($P < 0.05$); b. 与对照组 B 比较, 差异极显著($P < 0.01$)。下同。

由表1可知,在实验初期各组小鼠体质量无显著性差异,随着饲喂时间的延长,实验组 A 小鼠体质量呈“V”字形变化($P < 0.05$),对照组 B 和对照组 C 小鼠体质量均呈增加趋势。适应性喂养阶段3组小鼠均饲喂全价营养鼠粮,实验阶段实验组改喂纤溶豆豉,部分小鼠可能对其不适应,总体进食量较后期少,故实验组 A 小鼠体质量在10d前略有降低;但整个实验期饲喂豆豉对小鼠体质量无较大影响,各组均未见明显的毒副作用,小鼠生长情况良好。

2.3 饲喂纤维豆豉对小鼠血栓尾巴长度的影响

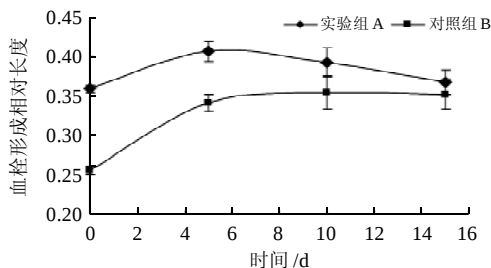


图1 纤溶豆豉对小鼠尾部血栓形成相对长度的影响

Fig.1 Effect of fibrinolytic Douchi on relative length of infarcted regions in the tails of mice

由图1可知,实验组 A 和对照组 B 在饲喂纤溶豆豉

0~5d时,尾部血栓形成相对长度都有变长,但实验组 A 与对照组 B 相比,其血栓形成相对长度的增长趋势比较缓慢。5d后实验组 A 的血栓形成相对长度逐渐变短,而对照组 B 基本未发生变化。

2.4 饲喂纤溶豆豉对小鼠凝血功能的影响

由表2可知,实验组 A 小鼠饲喂第10天,凝血酶原时间和凝血酶时间没有发生明显变化,饲喂15d后凝血酶原时间($P < 0.01$)和凝血酶时间($P < 0.05$)均显著延长;对照组 B 在整个饲喂过程中凝血酶原时间、凝血酶时间呈降低趋势;对照组 C 无显著性变化。

2.5 饲喂纤溶豆豉对小鼠纤溶系统的影响

表3 纤溶豆豉对FIB、D-dimer的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 3 Effect of fibrinolytic Douchi on FIB and D-dimer in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	FIB 含量/(g/L)			D-二聚体		
	5d	10d	15d	5d	10d	15d
实验组 A	4.79 $\pm$ 0.64	4.69 $\pm$ 1.63	4.56 $\pm$ 1.32	—	+	+
对照组 B	5.82 $\pm$ 1.47	5.61 $\pm$ 1.12	6.21 $\pm$ 1.57	—	—	—
对照组 C	5.11 $\pm$ 0.91	5.15 $\pm$ 2.20	5.29 $\pm$ 1.71	—	—	—

注: +, 阳性, 有 D-二聚体; —, 阴性, 无 D-二聚体。

由表3可知,实验组小鼠饲喂10、15d FIB 含量相应降低,但差异性未达到显著水平,D-二聚体均呈阳性;对照组 B 的 FIB 含量呈先降低后升高变化,D-二聚体均呈阴性;对照组 C 的 FIB 含量无显著性变化,D-二聚体均呈阴性。

3 讨论

3.1 动物血栓模型的复制

血栓的形成是凝血、抗凝、纤溶系统及血液流变学、血管内细胞、血小板等多种因素综合作用造成^[14]。本研究选用角叉菜胶造成小鼠尾部血栓模型,角叉菜胶是从海藻中提取的含硫酸多糖物质,是目前较常用的血栓诱导剂,小鼠经腰背部皮下注射角叉菜胶,引起炎症损伤血管内皮细胞,致使炎症细胞趋化、浸润,激活外源性凝血系统,造成混合性血栓形成。该血栓模型操作简单易行,对小鼠伤害小,适用于饮食治疗和预防型的血栓模型。

3.2 饲喂纤溶豆豉对小鼠尾部血栓形成的影响

角叉菜胶造成小鼠血栓模型, 该模型在血栓尾巴形成后继续饲喂一段时间, 血栓形成尾巴会因组织坏死陆续掉落。本研究在饲喂后期也出现了血栓形成尾巴掉落的现象, 为了能准确记录小鼠尾部血栓形成的长度, 避免因血栓形成尾巴的掉落造成较大的误差, 在实验过程中选择测量小鼠尾部没有暗红色血栓的部分。

本研究中饲喂纤溶豆豉 5d 时, 实验组 A 和对照组 B 的血栓形成相对长度都较 0d 时变长, 这是因为该血栓模型在小鼠注射角叉菜胶 72h 后尾部血栓形成长度才不再发生变化, 而本研究是在小鼠注射角叉菜胶 24h 后开始饲喂纤溶豆豉, 血栓还会继续形成, 因此在饲喂前 5d 血栓长度会变长; 同时实验组 A 较之对照组 B, 其血栓相对长度的增长趋势比较缓慢, 这说明食用纤溶豆豉有预防血栓形成的作用, 这与张炳文等^[3]的研究结果相似。饲喂 5d 以后, 实验组血栓相对长度逐渐变短, 而对照组 B 未发生变化, 说明食用纤溶豆豉有治疗和缓解血栓形成的作用。

3.3 饲喂纤溶豆豉对动物凝血系统的作用

凝血酶原时间、凝血酶时间是反映凝血系统变化较敏感和常用的筛选指标, 可判断抗栓药物的疗效。凝血酶原时间延长见于先天性凝血因子 II、V、XII、X 缺乏症, 低(无)纤维蛋白原血症、DIC、口服抗凝剂等, 凝血酶原时间缩短见于高凝状态、血栓性疾病等。凝血酶时间延长见于纤维蛋白原机能不良症、纤维蛋白降解产物(FDP)增多等。

本研究中饲喂纤溶豆豉的实验组小鼠在 5d 和 10d 后凝血酶原时间、凝血酶时间两个指标未出现显著性变化, 但饲喂 15d 后明显延长, 这说明纤溶豆豉具有一定的抑制机体凝血系统作用, 但需要食用一定时间后才可表现, 纤溶豆豉可作为预防和控制血栓性疾病发生的保健食品。

3.4 饲喂纤溶豆豉对动物纤溶系统的作用

纤溶系统主要包括纤溶酶原(FIB)的激活与纤维蛋白的降解。纤维蛋白是血栓的主要成分, 也是纤溶酶的底物, 在溶栓药物的效果评价中, 常测定 FDP 作为纤维蛋白降解水平指标, 但 FDP 也可以是纤维蛋白酶降解纤维蛋白原的产物, 因而 FDP 的升高并不一定表示血栓的形成或溶解。D-二聚体是纤维蛋白降解的特征性产物, 它的升高特异性地指示体内有血栓形成或溶栓治疗有效^[15]。FIB 是纤维蛋白(血栓)的前体, 血栓前状态和血栓性疾病时, 机体凝血功能增强, 血浆中 FIB 含量增多^[16]。纤溶系统活性增强, FIB 被分解, 血浆中 FIB 含量降低, 但 FIB 被纤溶酶过度降解时, 常伴有全身出血倾向, 应予以注意; 凝血酶时间可反映纤溶酶作用纤维蛋白原的情况。

Zhao Jing 等^[17]研究了蚓激酶(30kD)的肠道吸收, 将小鼠十二指肠保温培养在含蚓激酶的营养液中, 发现有 10%~15% 蚓激酶被肠上皮吸收, 最高达 30%, 并在肠上皮细胞中检测到了蚓激酶的存在; 通过腹腔注射发现小鼠血清中存在约 10% 蚓激酶, 表明这种蛋白质大分子能够穿肠而过, 通过肠上皮进入血液; 其功能因子

Protease-III-1 (Ef P-III-1)具有激活凝血酶原和纤维蛋白原水解的促凝和抗凝双重功效。本研究考察了饲喂纤溶豆豉对小鼠血栓模型的效果, 随着小鼠食用豆豉时间的延长实验组 FIB 含量逐渐减少, 10d 后血浆 D-二聚体呈阳性, 而未饲喂纤溶豆豉对照组 A 的 FIB 含量先降低后升高, D-二聚体呈阴性, 说明较长时间饲喂纤溶豆豉可激活机体的纤溶系统; 饲喂纤溶豆豉的模型小鼠在 5d 和 10d 后凝血酶原时间、凝血酶时间未出现显著性变化, 但饲喂 15d 后明显延长, 说明纤溶豆豉具有一定的抑制机体凝血系统作用, 但其详细机制有待深入研究。由于纤溶豆豉进入胃肠道消化系统及吸收过程中, 其活性成分会部分降解, 造成活性降低或生成新的功能因子, 但也发现了食用纤溶豆豉的预防和辅助治疗血栓性疾病的效果, 这对于改进传统豆豉和开发口服溶栓剂具有重要指导意义。

参考文献:

- [1] 范晓丹, 郭勇. 豆豉纤溶酶: 一种潜在的新型溶栓药物[J]. 生命的化学, 2005(5): 427-429.
- [2] WANG Chengtao, JI Baoping, LI Bo, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(9): 750-758.
- [3] 张炳文, 蔺新英, 刘晓婷. 细菌型豆豉激酶对小鼠尾静脉血栓模型的保护作用研究[J]. 中国食物与营养, 2010(12): 58-60.
- [4] TERADA T, INUI K. Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery[J]. Current Drug Metabolism, 2004, 5(1): 85-94.
- [5] YANG C Y, DANTZIG A H, PIDGEON C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability[J]. Pharmaceutical Research, 1999, 16(9): 1331-1343.
- [6] LEE C K, SHIN J S, KIM B S, et al. Antithrombotic effects by oral administration of novel proteinase fraction from earthworm *Eisenia andrei* on venous thrombosis model in rats[J]. Arch Pharmac Res, 2007, 30(4): 475-480.
- [7] CAPRARO J, CLEMENTE A, RUBIO L A, et al. Assessment of the lupin seed glucose-lowering protein intestinal absorption by using *in vitro* and *ex vivo* models[J]. Food Chemistry, 2011, 125(4): 1279-1283.
- [8] WOOD K W, STONE G M, PEPPAS N A. The effect of complexation hydrogels on insulin transport in intestinal epithelial cell models[J]. Acta Biomaterialia, 2010, 6(1): 48-56.
- [9] 贺华君, 施惠娟, 袁勤生. 口服外源 SOD 的完整生物大分子吸收的研究[J]. 药物生物技术, 1999, 6(3): 159-163.
- [10] 王成涛, 郑杰, 籍保平, 等. 豆豉纤溶酶 Subtilisin FS33 的溶栓作用及机制的研究[J]. 营养学报, 2007, 29(6): 600-604.
- [11] 窦灿, 任文雅, 廖永红. 酶解大豆蛋白条件优化研究[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2011, 29(2): 28-32.
- [12] 胡三觉, 田巧莲. 一种新的体内血栓形成动物模型[J]. 中华血液学杂志, 1993, 14(10): 541-542.
- [13] 邓家栋, 杨崇礼, 杨天枢. 血液病实验诊断[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1985: 368-370.
- [14] KAMIYA S, HAGIMORI M, OGASAWARA M, et al. *in vivo* evaluation method of the effect of nattokinase on carrageenan-induced tail thrombosis in a rat model[J]. Acta Haematol, 2010, 124(4): 218-224.
- [15] DALE S, GOGSTARD G O, BROSTAD F, et al. Comparison of three D-dimer assays for the diagnosis of DVT: ELISA, latex and an immunofiltration assay[J]. Thrombosis and Haemostasis, 1994, 71(3): 270-271.
- [16] XIAO Rong, LI Qingwei, PERRETT S, et al. Characterisation of the fibrinolytic properties of the buccal gland secretion from *Lampetra japonica*[J]. Biochimie, 2007, 89(3): 383-392.
- [17] ZHAO Jing, PAN Rong, HE Jian, et al. *Eisenia fetida* protease-III-1 functions in both fibrinolysis and fibrogenesis[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2007, 2007: 97654.