

重组人尿激酶原对家兔下腔静脉血栓的抑制作用研究

孙双勇^{1△}, 丁文侠^{2△}, 孙倩², 郝春华¹, 王维亭¹, 李欣欣², 赵专友^{1*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天士力制药集团股份有限公司, 天津 300410

摘要: **目的** 研究注射用重组人尿激酶原(rhPro-UK)对家兔下腔静脉血栓的溶栓作用, 观察其出血副作用以及对凝血功能的影响, 并对其作用机制进行探讨。**方法** 家兔采用电刺激伴狭窄法制备下腔静脉血栓模型, 5 d后耳缘iv 25、50、100 kU/kg rhPro-UK, 输注完毕1 h后测定家兔出血时间和出血量; 颈动脉取血分离血浆, 试剂盒法检测血浆凝血因子活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)以及纤维蛋白原(FG)含量, ELISA试剂盒检测血浆内纤溶酶原(Plg)水平; 取血栓, 测定血栓湿质量、干质量以及基质量。**结果** 家兔静脉注射rhPro-UK后, 出血时间有所延长, 出血量有所增加, FG和Plg水平均有一定程度的降低, 但凝血功能指标APTT、PT和TT均无显著增加。血栓湿质量、干质量及基质量均显著降低, 并具有一定的剂量相关性, 表明rhPro-UK对下腔静脉血栓有显著的抑制作用。**结论** rhPro-UK具有良好的抑制下腔静脉血栓作用, 作用机制与其特异性地催化血栓生成部位的纤溶酶原生成纤溶酶有关。

关键词: 注射用重组人尿激酶原; 家兔; 下腔静脉血栓; 溶栓作用

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2016)05-0582-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.05.004

Thrombolysis of recombinant human prourokinase on inferior vena cava thrombosis in rabbits

SUN Shuang-yong¹, DING Wen-xia², SUN Qian², HAO Chun-hua¹, WANG Wei-ting¹, LI Xin-in², ZHAO Zhuan-you¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd, Tianjin 300301, China

2. Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To study thrombolysis of Recombinant Human Prourokinase (rhPro-UK) for injection on inferior vena cava thrombosis in rabbits, observe its bleeding side effect and its effect on coagulation function, and explore its mechanism. **Methods** Inferior vena cava thrombosis model in rabbits were established by electrical stimulation and stenosis. rhPro-UK of 25, 50, and 100 kU/kg were injected into the ear vein of rabbits after 5 d. Bleeding time and blood loss were measured 1 h after infusion. Blood was taken from the jugular vein and prepared into plasma. Activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT), and fibrinogen (FG) were determined by kits, and plasminogen level in plasma was determined by ELISA method. Thrombus was taken out, and wet weight, dry weight, and base quality of thrombus were weighed. **Results** Bleeding time and blood loss of rabbits were extended, and levels of FG and Plg were reduced slightly, but there was no significant increase in coagulation parameters APTT, PT and TT. Wet weight, dry weight, and base quality of thrombus were all significantly reduced in a dose-dependent manner after iv rhPro-UK, which indicated that rhPro-UK had a significant inhibitory effect on deep vein thrombosis. **Conclusion** rhPro-UK has a good inhibitory effect of inferior vena cava thrombosis, and its mechanism of action is related to its specific catalytic action of promoting plasminogen in angiogenesis site to generate plasmin.

Key words: Recombinant Human Prourokinase for injection; rabbit; inferior vena cava thrombosis; thrombolysis

收稿日期: 2016-01-13

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划青年项目(14JCQNJC13300)

作者简介: 孙双勇(1984—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事心血管药物新药评价研究。Tel: (022)84845255 E-mail: sunshuangyong@163.com

丁文侠, 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事心血管临床研究。Tel: (022) 86343638 E-mail: tingwx@tasly.com

*通信作者 赵专友, 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事心血管药物新药评价。Tel: (022)84845267 E-mail: zhaozy@tjipr.com

△ 孙双勇和丁文侠对本文贡献相同

尿激酶原是一种蛋白酶,广泛分布于人和动物体内,在体内具有多种生理功能。它与组织纤溶酶原激活剂(t-PA)、凝血酶、凝血因子对体内的凝血和出血起平衡作用^[1],此外它还参与炎性细胞的迁移、子宫基膜的扩展、卵子受精过程、退化器官的溶解、癌细胞的侵染与扩散以及信号传递、神经细胞发育与分化等重要的病理生理过程^[2]。尿激酶原作为新的血栓溶解剂经常被用于治疗急性心肌梗死,有关其抑制下腔静脉血栓的形成报道较少^[3]。本实验采用家兔下腔静脉电刺激联合狭窄的方法制备下腔静脉血栓模型,观察注射用重组人尿激酶原对下腔静脉血栓的抑制作用,观察其出血副作用以及对凝血功能的影响,并对其作用机制进行探讨。

1 材料与仪器

1.1 药品及试剂

注射用重组人尿激酶原(rhPro-UK),白色冻干粉,5 mg(50万单位)/支,批号20140701,上海天士力药业有限公司提供。临用前以注射用水溶解,并用生理盐水稀释至所需浓度供动物静脉给药用。

注射用尿激酶(UK),规格10万单位/支,批号041404061,天津生物化学制药有限公司生产。临用前以注射用水溶解,并用生理盐水稀释至所需浓度供动物静脉给药用。

凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FG)测定试剂盒均由天津美德太平洋科技有限公司生产,批号分别为011412A、031404A、021412A、041403A;兔纤溶酶原(Plg)酶联免疫试剂盒,武汉华美生物科技有限公司生产,批号C658250126;蛋白定量试剂盒,北京索莱宝科技有限公司生产,批号20131011。

1.2 动物

家兔,雄性,体质量2.2~2.4 kg,北京隆安实验动物养殖中心提供,动物生产许可证号SCXK(京)2009-0005。

1.3 仪器

LG-PABER型凝血因子分析仪,北京世帝科学仪器公司;RT-6100型酶标分析仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司;

WZ-50 C2微量输注泵,浙江大学医学仪器有限公司;Sartorius BT 125D电子分析天平,北京赛多利斯天平有限公司;LD5-2 A离心机,北京医用离心机厂。

2 方法

2.1 血栓模型的制备

家兔禁食过夜,iv戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉后,仰卧位固定于手术台上,依照文献报道电刺激伴狭窄法^[4]并加以改进制备家兔下腔静脉血栓模型。腹部手术野剃净兔毛,碘酊消毒,沿腹中线开腹,切口约长5 cm;分离左侧肾脏远心端的下腔静脉,结扎一段15 mm血管段,血管腔内插入0.5 cm长针状阳极电极,阴极插入动物皮下形成环路。刺激电流为1 mA,时间15 min。接通直流电后在阳极形成活性氧离子,对血管内皮产生损伤,从而在血管内皮慢慢形成血栓。电刺激结束后将电极取出,松开血管段两端的结扎线;再于受损的下腔静脉近心端狭窄至原先的1/5。逐层缝合腹壁,动物清醒后回笼饲养。为防感染肌肉注射青霉素(20万单位)。

2.2 分组与给药

血栓慢慢形成5 d后,将无腹部感染的家兔按照体质量随机分组,每组10只。对照组给予等体积的生理盐水,尿激酶组给予50 kU/kg UK,重组人尿激酶原组给予25、50、100 kU/kg rhPro-UK。采用耳缘静脉给药,先静脉推注总给药剂量的10%,剩余90%剂量恒速静脉输注1 h。给药体积均为1 mL/kg。

其中UK给药剂量依据临床使用剂量换算而来,rhPro-UK的中间剂量等同于UK使用剂量,以便于进行组间比较。

2.3 对出血的影响

家兔静脉滴注完毕1 h后,测定家兔出血时间。用专制的刀片于家兔舌的正面作1个标准切口(深1 mm、长5 mm),随后每隔20秒以滤纸吸附1次切口部位血液,并小心避免与伤口接触,切口起始至滤纸不再黏附血迹为止的间隔时间为出血时间;对滤纸吸附血液前后进行称定质量,计算流出血液总质量,即为出血量。

2.4 对系统纤溶及凝血参数的影响

家兔行颈总动脉插管取血,3.8%枸橼酸钠按照全血、抗凝剂比例9:1抗凝,3 000 r/min离心10 min后取血浆,置于-80℃冰箱内,用于后续检测。PT、TT、APTT、FG采用凝固法测定;Plg采用ELISA试剂盒法检测。

2.5 对血栓的溶解作用

实验结束后,取血栓形成部位的血管段,纵向剖开血管,将血栓纵向切开分成2份,分别称定湿

质量后,一部分烤箱内烤至恒定质量,用于折算血栓干质量;另一部分用 0.5 mol/L NaOH 溶解,定量测定血栓基质量。最后根据初始分成的两部分比例进行结果校正,计算全血栓的干质量和血栓基质量。

2.6 数据统计

以 SPSS 16.0 软件进行数据的统计学分析,计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$, 组间比较用 One-Way ANOVA, 方差齐者用 LSD 检验, 方差不齐者用 Games-Howell 检验。

3 结果

3.1 重组人尿激酶原对家兔出血的影响

家兔 iv rhPro-UK 后, 出血时间有所延长, 与对照组比较, rhPro-UK 50、100 kU/kg 组差异均具有显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组比较, UK 组出血时间亦明显增加 ($P < 0.01$)。与等剂量的 UK 组比较, rhPro-UK 50 kU/kg 组的出血时间明显缩短 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

家兔 iv rhPro-UK 后, 出血量有所增加, 与对照组比较, rhPro-UK 50、100 kU/kg 组差异均具有显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组比较, UK 组出血量亦明显增加 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与等剂量的 UK 组比较, rhPro-UK 50 kU/kg 组的出血量明显降低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 重组人尿激酶原对家兔出血时间及出血量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of rhPro-UK on bleeding time and blood loss in rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(kU·kg ⁻¹)	出血时间/s	出血量/mg
对照	—	129.4 ± 32.6	84.7 ± 31.1
UK	50	236.9 ± 73.1**	238.5 ± 67.9***
rhPro-UK	25	153.2 ± 51.7	108.5 ± 52.2
	50	174.3 ± 45.7* [#]	159.4 ± 76.4* [#]
	100	209.1 ± 55.9**	194.9 ± 77.3**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与等剂量 UK 组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, [#] $P < 0.05$ vs UK group with the same dose

3.2 重组人尿激酶原对家兔血浆内 FG 与纤溶酶原水平的影响

家兔 iv rhPro-UK 后, 与对照组比较, 血浆 FG 水平显著降低, rhPro-UK 50、100 kU/kg 组差异均具有显著性 ($P < 0.01$); UK 组 FG 水平与对照组比较显著降低 ($P < 0.001$)。结果见表 2。

对照组血浆内纤溶酶原水平为 13.8 μg/mL, iv rhPro-UK 后, 纤溶酶原水平有一定程度的降低, 与对照组比较, rhPro-UK 50、100 kU/kg 组差异均具有显著性 ($P < 0.01$ 、 0.001)。UK 组纤溶酶原水平也明显降低 ($P < 0.001$), 且降低幅度更大。结果见表 2。

表 2 重组人尿激酶原对家兔血浆内 FG 与纤溶酶原水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of rhPro-UK on levels of FG and plasminogen in plasma of rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(kU·kg ⁻¹)	FG/(g·L ⁻¹)	纤溶酶原/(μg·mL ⁻¹)
对照	—	4.6 ± 0.9	13.8 ± 1.8
UK	50	2.8 ± 0.7***	9.9 ± 1.7***
rhPro-UK	25	4.0 ± 0.9	12.4 ± 2.3
	50	3.5 ± 0.4**	11.1 ± 1.2***
	100	3.4 ± 0.8**	10.8 ± 2.1**

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

3.3 重组人尿激酶原对家兔血浆凝血参数的影响

家兔 iv rhPro-UK 后, 血浆 APTT 有所延长, 但与对照组比较差异无显著性; 与对照组比较, UK 组血浆 APTT 显著延长 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

血浆 PT 与对照组比较无明显变化; UK 组血浆 PT 变化亦不明显。结果见表 3。

与对照组比较, rhPro-UK 组血浆 TT 无显著变化; UK 组血浆 TT 则显著延长 ($P < 0.001$)。结果见表 3。

3.4 重组人尿激酶原对血栓的溶解作用

家兔下腔静脉电刺激后, 下腔静脉内形成明显血栓。5 d 后血栓湿质量均值为 128.1 mg。家兔血栓形成后 iv rhPro-UK 50、100 kU/kg 后, 血栓湿质量明显降低 ($P < 0.001$), 具有明显的溶栓作用, 并呈现一定的量效关系。给予 UK (50 kU/kg) 后, 血栓湿质量较对照组亦显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

取材称定质量后, 将其烘干至恒定质量。对照组血栓干质量均值为 62.1 mg。给予 rhPro-UK 25、50、100 kU/kg 后, 与对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 可以剂量相关性地减轻血栓干质量。给予 UK (50 kU/kg) 后, 其血栓干质量较对照组亦明显降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

家兔静脉血栓使用 0.5 mol/L NaOH 处理后, 使用蛋白定量试剂盒测定血栓内基质量。结果显示, 对照组血栓内基质量均质量 16.7 mg, 家兔 iv

rhPro-UK 25、50、100 kU/kg 后, 其血栓基质量明显降低, 与对照组比较差异均有显著性 ($P<0.01$ 、 0.001); 家兔 iv UK (50 kU/kg) 后, 血栓内基质量较对照组亦明显降低 ($P<0.001$)。见表 4。

与等剂量的 UK 组比较, rhPro-UK 50 kU/kg 组的血栓湿质量、干质量及基质量均显著降低 ($P<0.001$), 表明 rhPro-UK 的溶栓效果要显著优于 UK,

见表 4。分别以对照组血栓平均湿质量、干质量及基质量为 100%, 计算各剂量组 3 个指标的抑制率, 经线性拟合分别得方程 $Y=87.4 \lg X-89.4$, $r=0.99$; $Y=87.2 \lg X-86.4$, $r=0.98$; $Y=76.6 \lg X-68.6$, $r=0.95$ 。进而推算得 rhPro-UK 使血栓湿质量、干质量、基质量减少一半的剂量 (ED_{50}) 分别为 39.4、36.7、35.4 kU/kg。

表 3 重组人尿激酶原对家兔血浆 APTT、PT 和 TT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 3 Effect of rhPro-UK on APTT, PT, and TT in plasma of rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(kU·kg ⁻¹)	APTT/s	PT/s	TT/s
对照	—	17.1±4.5	7.1±1.3	11.3±1.7
UK	50	23.3±4.1**	7.3±0.6	15.9±2.2***
rhPro-UK	25	19.5±4.5	6.7±0.5	11.7±0.6
	50	20.0±5.8	7.1±0.3	11.2±1.1
	100	21.6±6.0	7.2±0.6	12.0±1.8

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

表 4 重组人尿激酶原对家兔电刺激形成静脉血栓质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of rhPro-UK on venous thrombosis weight caused by electrical stimulation in rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(kU·kg ⁻¹)	湿质量/mg	干质量/mg	血栓基质量/mg
对照	—	128.1±53.4	62.1±25.4	16.7±5.1
UK	50	69.7±11.6**	32.9±5.1**	8.7±1.4***
rhPro-UK	25	89.0±21.4	41.8±8.6*	11.0±2.8**
	50	46.8±4.2***###	20.3±3.5***###	5.0±1.3***###
	100	21.6±12.1***	9.2±5.1***	3.3±1.9***

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与等剂量 UK 组比较: ### $P<0.001$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; ### $P<0.001$ vs UK group with the same dose

4 讨论

rhPro-UK 是第 2 代溶栓药, 又称单链尿激酶型纤溶酶原激活剂, 属丝氨酸蛋白酶系列。1973 年, Bernik 首先在组织培养液中发现了尿激酶原, 接着 1979 年 Husain 等从尿中纯化出一种新的高分子单链尿激酶, 1981 年 Wu 等证明它是尿激酶的前体, 因此称之为重组人尿激酶原^[5-6]。

在本实验中, 采用电刺激法使下腔静脉血栓内皮造成损伤, 在损伤区域会逐渐形成微小的血栓, 狭窄下腔静脉近心端, 可使血流减缓, 血栓在刚形成时不会因此被血流带走, 随着时间的推移, 在电刺激区域将形成静脉血栓, 该方法比单纯电刺激或结扎的方法能更好地模拟下腔静脉血栓的形成过程。

家兔下腔静脉血栓形成 5 d 后, 缓慢静脉输注 rhPro-UK, 能够剂量相关性地降低血栓湿质量、干

质量及基质量, 表明 rhPro-UK 对下腔静脉血栓有明显的抑制作用。UK 亦有一定的溶栓作用, 但作用强度明显低于等剂量的 rhPro-UK, 表明 rhPro-UK 的溶栓效果优于 UK。在出血副作用方面, 家兔静脉注射 rhPro-UK 后, 出血量和出血时间均有不同程度的延长, 但与 UK 比较, 出血时间、出血量均显著降低, 表明其在发挥更好的溶栓效果的同时, 出血副作用也更小。在对凝血功能的影响方面, 家兔静脉注射 rhPro-UK, 25、50、100 kU/kg 组 APTT、PT 以及 TT 均无明显变化, 表明其对凝血功能无显著影响; 家兔静脉注射 UK 后, APTT 及 TT 均明显增加, 表明其对家兔凝血功能造成影响, 使凝血时间延长。综上, rhPro-UK 的溶栓效果优于 UK, 而在出血副作用以及对凝血功能的影响方面明显低于 UK, 表明其比 UK 更加适用于溶栓的药物治疗。

前期研究表明^[7-8], rhPro-UK 本身无催化活性, 进入人体后能特异性地与血栓部位的纤维蛋白结合而呈现活性, 从而使血栓吸附的纤溶酶原转化成纤溶酶, 纤溶酶具有降解血栓中交联纤维蛋白的能力, 从而使血栓溶解; 尿激酶则可直接激活纤溶蛋白酶原转变成纤溶酶, 进而发挥溶栓作用。前者为间接激活纤溶酶, 后者则为直接激活发挥作用。两者作用机制相似, 溶栓效果及出血副作用等方面却差异显著。分析其根本原因可能在于, rhPro-UK 在形成有活性的尿激酶前, 需要血栓部位的纤维蛋白的存在, 而在无血栓组织的正常血管内, 纤维蛋白通常以纤维蛋白原的形式存在, rhPro-UK 的作用主要集中在血栓形成部位, 而对血浆中的纤维蛋白原分解较少, 因此对全身的纤溶活性影响较小。UK 进入血液后, 直接激活血浆中的纤维蛋白原, 在溶解血栓纤维蛋白的同时, 需要消耗血浆中的纤维蛋白原、凝血因子V、凝血因子VII等, 从而导致身体处于纤溶状态, 使得出血时间延长, 凝血功能受损。在本实验中, 家兔静脉注射 rhPro-UK 后, 血浆内的纤维蛋白原、纤溶酶原水平均有所降低, 但降低程度均低于 UK 组, 进一步表明 rhPro-UK 作用于血栓形成部分, 具有血纤维专一性, 这种专一性使其出血副作用更小, 用于溶栓治疗时也更加安全。

参考文献

- [1] Zhang Z G, Xiao C Z, Hu X W, *et al.* Overview of investigation of pharmacodynamics, pharmacology, and toxicology of domestic human prourokinase [J]. *Sci Sin*, 2011, 41(10): 1024-1029.
- [2] 胡金勇, 曾 英, 桑玉英, 等. 尿激酶型纤溶酶原激活剂的研究 [J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23(2): 67-71.
- [3] 王丽英, 王国军, 张彦玲, 等. 注射用重组人尿激酶原溶栓治疗急性心肌梗死的临床效果观察 [J]. 临床误诊误治, 2015, 28(5): 107-109.
- [4] 孙一来, 赵 渝, 向 志, 等. 蕲蛇酶联合肝素治疗兔急性下腔静脉血栓的实验研究 [J]. 中华普通外科杂志, 2010, 25(7): 562-565.
- [5] Bernik M B. Increased plasminogen activator (urokinase) in tissue culture after fibrin deposition [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52(4): 823-834.
- [6] Van de Werf F, Nobuhara M, Collen D. Coronary thrombolysis with human single-chain, urokinase-type plasminogen activator (pro-urokinase) in patients with acute myocardial infarction [J]. *Ann Intern Med*. 1986, 104(3): 345-348.
- [7] 王贵鑫, 吕 莉. 溶栓药物的药理学研究进展 [J]. 血栓与止血学, 2011, 17(5): 234-236.
- [8] 赵专友, 刘蓓钊, 刘厚孝, 等. 重组人尿激酶原药效学研究 [J]. 南京大学学报: 自然科学版, 2001, 37(4): 420-434.