

## 蛋白类抗凝血药物的研究进展

曹政红<sup>1,2</sup>, 付刚<sup>1</sup>, 龚珉<sup>1</sup>, 徐为人<sup>1\*</sup>

1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

**摘要:** 血栓性疾病包含血栓形成和血栓栓塞所引起的疾病, 又称血栓栓塞性疾病, 是人类常见的多发病, 严重危害人类的健康, 是现代社会的致死性疾病之一。抗凝血药物是通过影响凝血过程中的某些影响因子来阻止血液凝固, 从而起到预防与治疗血栓栓塞性疾病的作用。多肽等蛋白类抗凝血药见效快、不良反应小, 是今后抗凝药研究的重点。对抗凝血多肽等蛋白类抗凝药物进行了评述。

**关键词:** 血栓; 抗凝血; 凝血机制; 多肽

**中图分类号:** R973      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674-5515(2012)05-0503-04

## Research progress in protein anticoagulants

CAO Zheng-hong<sup>1,2</sup>, FU Gang<sup>1</sup>, GONG Min<sup>1</sup>, XU Wei-ren<sup>1</sup>

1. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract:** Thrombotic disease, caused by thrombosis and thromboembolism, was also called thromboembolic disease, which is a common frequently-occurring disease. It is seriously harmful to human health and is one of the major causes of death in modern society. Anticoagulant drugs prevent blood clotting by influencing some impact factors in the blood coagulation process, and play an important role in prevention and treatment of the thromboembolic disease. Biological anticoagulant drugs, for example polypeptide, which have many advantages such as taking quickly effect but low side effects, are mostly becoming the emphasis in the study on anticoagulants. In this paper, several anticoagulant polypeptides and biological kinds of anticoagulation drugs have been reviewed.

**Key words:** thrombus; anticoagulation; clotting mechanism; polypeptides

血液成分流动过程中在血管或心脏内膜表面形成的一种半凝块状物质即为血栓, 血栓病是由血栓引起的血管腔狭窄与闭塞, 使主要脏器发生缺血和梗塞, 从而引发的各种疾病, 是心肌梗死、缺血性脑梗死、静脉血栓栓塞等心血管疾病的重要致病原因。随着科研水平的提高, 除了传统的抗血栓药物外, 研发了一些新的药物。临床常见的各种防治血栓的药物主要有抗血小板药、抗凝血药和纤维蛋白溶解药, 其中抗凝血是治疗血栓的重要方法。通过影响凝血过程中的某些影响因子来阻止血液凝固的抗凝药物临床上常用的有肝素、华法林等。由于普通肝素需要活化部分凝血活酶时间才能够定期监

测, 低相对分子量肝素是静脉注射制剂, 华法林起效慢、疗效波动大等原因使得有必要进一步研发抗凝药物, 因此抗凝血多肽等蛋白类抗凝药物的研究引起了广泛的关注。

### 1 凝血机制

迄今为止, 共发现 12 个经典的凝血因子(FI~FV、FVII~XIII) 和 2 个激肽系统因子, 分别为激肽释放酶原 (prekallikrein, PK) 与高相对分子量激肽原 (high molecular weight kininogen, HMWK)<sup>[1]</sup>。人体内有内源性和外源性凝血两条途径, 前者都依靠血浆中的凝血因子激活使 IXa 因子与 VIIIa 结合成复合物, 进一步激活 X 因子生成 Xa

收稿日期: 2012-06-02

作者简介: 曹政红(1987—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事生物药合成和药理学研究。Tel: 13920790306 E-mail: caozhenghong1987@163.com

\*通讯作者 徐为人, 研究员, 博士生导师。Tel: (022) 23006862 E-mail: xuwr@tjipr.com

因子。而后者是血管外组织因子在磷脂和钙离子存在下迅速激活 X 因子生成 Xa 因子。

## 2 抗凝血机制

人体内存在 3 种抗凝物质调控凝血过程：抗凝血酶 III (ATIII)、活化的蛋白质 C 和组织因子途径抑制物 (TFPI)。如肝素的抗凝机制主要由 ATIII 来介导，华法林则通过拮抗维生素 K 的转化来影响抗凝过程。ATIII 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂，凝血因子 IIa、VII、Xa、IXa、XIIa 的活性中心均有丝氨酸残基，都属于丝氨酸蛋白酶。ATIII 分子上的精氨酸残基与这些酶活性中心的丝氨酸残基结合而使之失活。

## 3 多肽及肽类似物抗凝血药物

抗凝效果好、可口服、起效快、不良反应小是抗凝药物的目标，因此小肽以及可口服的小分子类肽或化合物是重点研究方向。

### 3.1 重组水蛭素

1884 年 Haycraft 首先发现水蛭提取物中含有抗凝血物质，水蛭素(hirudin)是存在于蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman 唾液腺里的一种生物活性物质。1955 年 Markwardt 等成功地分离了天然水蛭素，其由 65 个氨基酸残基组成，相对分子质量为  $7 \times 10^3$ ，N 端含许多半胱氨酸，半胱氨酸相互间形成了 3 个二硫键。C 端含 6 个酸性氨基酸残基，游离在分子表面。肽链中部还有一个由 Pro-Lys-Pro 组成的特殊序列起稳定作用。重组水蛭素地西卢定 (desirudin)、来匹卢定 (lepirudin) 是水蛭素的重组变体。由于第 63 位的 Tyr 残基无磺酸化，以致两者对凝血酶的亲和力比天然水蛭素降低 10 倍，但无疑仍是很强的凝血酶抑制剂。来匹卢定是第一个被批准用于临床的凝血酶抑制剂，其能够对肝素诱导引发的血小板减少症并发形成血栓起到治疗作用。

水蛭素衍生出很多小分子多肽，比伐卢定 (bivalirudin) 的功能较好，近年来用于临床的直接凝血酶抑制剂，2000 年批准美国上市。比伐卢定为含 20 个氨基酸、相对分子质量为 2 180 的多肽。其氨基端的 D-Phe-Pro-Arg-Pro 区域与凝血酶的活性位点发生特异性结合，直接抑制凝血酶活性，从而起到抗凝作用<sup>[2]</sup>。比伐卢定与凝血酶的结合是可逆的，静脉给药后约 15 min 出现浓度高峰，半衰期为 25 min。能被内生肽与肝脏降解，故利于肾功能低下者应用。国外一系列 III 期临床试验证明了其在经皮冠状动脉介入治疗、心脏外科等手术中作为抗凝

剂是安全有效的，在国外已广泛应用于临床<sup>[3]</sup>。

### 3.2 阿加曲班

阿加曲班 (argatroban) 是精氨酸 (L-arginine) 的衍生物，相对分子质量为 527，属于低分子凝血酶抑制物，结构见图 1。由于阿加曲班直接与凝血酶的催化活性位点 (含 Ser-His-Arg) 结合从而灭活凝血酶，结合速度快，同时也是一个完全可逆的过程。阿加曲班的半衰期为 39~51 min，口服吸收率较低，无明显的不良反应。

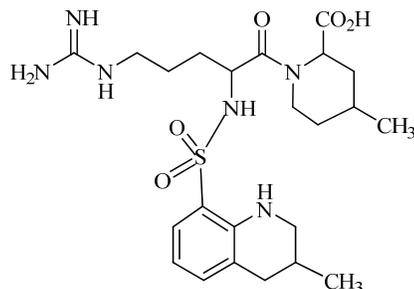


图 1 阿加曲班的结构

Fig. 1 Structure of argatroban

### 3.3 美拉加群与希美加群

美拉加群 (melagatran) 是纤维蛋白二肽类似物，可以竞争性直接抑制凝血酶。其抗凝机制是与凝血酶活性位点结合，从而抑制凝血酶。因其口服生物利用度低，须皮下注射。希美加群 (ximelagatran) 是美拉加群的前体药物，相对分子质量为 429。口服后经胃肠道吸收很好，能很快地转化为活性状态的美拉加群，半衰期为 3~4 h，其属于新一代的直接凝血酶抑制剂 (direct thrombin inhibitors, DTIs) 的第一个口服药物<sup>[4]</sup>。结构见图 2。

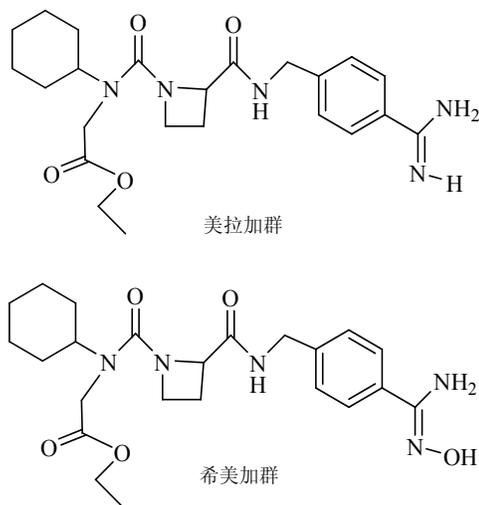


图 2 美拉加群和希美加群结构

Fig. 2 Structures of melagatran and ximelagatran

### 3.4 壁虱抗凝肽

壁虱抗凝肽 (tick anticoagulant peptide, TAP) 从非洲钝缘蜱属壁虱 *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) 中分离的强效 Xa 因子抑制剂, 由 60 个氨基酸组成的单链酸性肽, 含有 6 个半胱氨酸残基, 分子大小、结构与水蛭素类似。其通过与 Xa 因子结合, 从而阻止凝血激酶复合物的形成, 以抑制凝血酶原的激活。因而 TAP 能治疗和预防血管闭塞, 有望成为预防血栓形成的有效药。

### 3.5 钩虫抗凝肽

研究发现钩虫能分泌抗凝物来阻止被其咬伤的伤口凝血。目前对钩虫抗凝物质的研究有犬钩口线虫 *Ancylostoma caninum* Ercolani、锡兰钩虫 *Ancylostoma ceylanicum* Loose、十二指肠钩虫 *Ancylostoma duodenale* Dubini 等。1993 年从犬钩口线虫中分离出首个抗凝血肽, 其后证实该抗凝血肽能延长凝血酶原时间和活化部分凝血酶原激酶时间。彭礼飞等<sup>[5]</sup>对十二指肠钩虫蛋白 AduNAP7 及其组成肽 AduNAP7A、AduNAP7B 在大肠杆菌中的表达、纯化及其抗凝活性进行鉴定。结果显示 AduNAP7 抗凝、溶栓的效果更强。

### 3.6 其他抗凝肽

经研究发现蛇毒有抗凝血酶及凝血因子的作用, 而且也有血小板聚集作用。如黎渊弘等对蛇毒的磷脂结合抗凝蛋白的研究<sup>[6]</sup>。从非洲眼镜蛇蛇毒中分离出由 hemextin A、B 组成的天然抑制物, hemextin A 单独具有中等凝血活性, 而且 hemextin B 能增强 hemextin A 的抗凝作用。研究表明蜂毒在体内也有抗凝血和溶栓的作用, 可以显著地延长血液凝固的时间。

## 4 蛋白酶类抗凝血药物

### 4.1 肝素

肝素 (heparin) 是一种硫酸化的糖胺聚糖的混合物, 相对分子质量是  $3 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$ , 具有大量的硫酸基和羧基, 呈现强酸性, 可在体内外发挥抗凝作用。肝素被广泛用于预防和治疗静脉血栓, 从而使得深部静脉血栓的发病率和肺栓塞的死亡率明显的降低。

1916 年美国约翰霍普金斯大学医学院学生 McLean 发现了肝素的存在, 1937 年加拿大的 Best 和 Murray 首先将肝素应用到临床中<sup>[7]</sup>。肝素起效快, 可被鱼精蛋白中和, 体内消除半衰期短, 静脉注射后立即起效, 半衰期为 3~4 h, 因此仍是体外

循环抗凝的重要手段。由于肝素可以通过非肾途径进行代谢, 肾功能不好或不全的患者也可以服用肝素。因此肝素在导管、支架、瓣膜方面抗凝的效果更显著。但是肝素的不良反应主要是出血, 轻度为皮肤黏膜出血, 重度为胃肠道、颅内出血, 还会出现骨质疏松、诱发血小板减少等, 从而限制了其应用。

1976 年 Johnson 发现了低相对分子质量肝素, 是由普通肝素解聚和酶离得到的小片段。低相对分子质量肝素的相对分子质量为  $4 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ , 与血浆蛋白的亲合力不高, 因此其抗凝效果比较稳定, 而且对抗 Xa 的选择性高, 对 IIa 的作用相对降低。低相对分子质量肝素半衰期为 8~12 h, 生物半衰期明显比普通肝素长, 皮下注射吸收完全, 生物利用度约 90%。研究表明, 低相对分子质量肝素对关节矫形手术、腹部手术后静脉血栓栓塞的发生及再发有显著的预防作用, 剂量为 5 000 U/次, 1~2 次/d<sup>[8]</sup>。目前低相对分子质量肝素主要有亭扎肝素 (tinzaparin, 商品名 Innohep)、达肝素 (delteparin, 商品名法安明 Fragmin)、那屈肝素 (nadroparin, 商品名速避凝 Fraxiparine)、依诺肝素 (enoxaparin, 商品名克赛) 和磺达肝素钠 (fondaparinux sodium, 商品名方达帕鲁)。赛诺菲-安万特公司的依诺肝素已经成为预防静脉血栓栓塞和治疗急性冠脉综合征的常用药物<sup>[9]</sup>, 2009 年依诺肝素的全球销售额大约 40 亿美元。低相对分子质量肝素的不良反应主要是有出血, 注射部位会有瘀点、瘀斑, 血小板减少等。

### 4.2 蚓激酶

蚓激酶 (lumberokinase) 是从特种蚯蚓中分离出的具有溶解纤维蛋白及激活纤溶酶原作用的丝氨酸蛋白酶。1983 年日本 Mihara 首次从粉正蚓中提取, 到目前为止已从不同种类蚯蚓中提取出多种抗凝蛋白成分。1984 年清华大学等研究结果显示蚓激酶具有抗凝、溶栓及去纤作用。1995 年蚓激酶被卫生部批准生产, 其能降低血液黏稠度、减少血小板聚集、体内外良好的溶栓抗凝作用, 而且不良反应少, 因此大量应用于临床。

### 4.3 纳豆激酶

纳豆激酶 (nattokinase) 是在纳豆中存在的一种酶, 由 275 个氨基酸残基组成的一条单链多肽, 是由纳豆芽孢杆菌发酵而成。活性部位在 Asp<sup>32</sup>、His<sup>64</sup> 和 Ser<sup>221</sup>, 底物结合部位是 Ser<sup>125</sup>、Leu<sup>126</sup> 和 Gly<sup>127</sup>, 具有强烈的纤溶活性及良好的抗凝、溶栓

作用。

## 5 结语

静脉血栓栓塞严重危害人类健康, 抗凝血药物需抗凝活性好, 药效快, 无需实验室监测, 能有效的防止血栓的形成, 长期使用不良反应小, 可口服, 半衰期长等。但到目前为止尚未发现理想的适合临床应用的抗凝血药, 以多肽及类肽等为代表的生物类抗凝药正向理想目标发展, 此类药大多数为口服药, 疗效更好, 安全性更高, 不良反应更小。目前已经从水蛭、蚯蚓、蛇毒等生物体内克隆出很多抗凝血蛋白的 cDNA, 其中很多重组蛋白也成功的表达。随着分子生物学和基因工程技术的不断完善, 相信在将来会有更多安全高效的生物抗凝血药物的出现。

## 参考文献

- [1] 顾 峰, 胡宗利, 陈国平, 等. 抗凝血蛋白的抗凝溶栓机制 [J]. 生命科学, 2010, 22(8): 755-759.
- [2] Sinnaeve P R, Simes J, Yusuf S, *et al.* Direct thrombin

inhibitors in acute coronary syndromes: effect in patients undergoing early percutaneous coronary intervention [J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(22): 2396-2403.

- [3] 潘春梅, 向定成. 抗凝药比伐卢定国外临床应用进展 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(9): 725-727.
- [4] 王 秀, 夏 泉. 抗凝血药物临床应用的现状及研究进展 [J]. 安徽医药, 2011, 15(10): 1189-1192.
- [5] 彭礼飞, 邓 莉, 杨 陈, 等. 十二指肠钩虫抗凝蛋白 AduNAP7 的原核表达、纯化及抗凝活性鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(10): 1021-1-25.
- [6] 黎渊弘, 黎肇炎, 黄丙轮. 短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白对动物血栓的抗栓作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 34-36.
- [7] 王维亭, 郝春华, 赵专友, 等. 新型抗凝药物研发进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 10-24.
- [8] 林玫瑞. 低分子肝素对外科手术后血栓形成的预防作用 [J]. 中外医疗, 2009, 28(21): 92.
- [9] Tetri S, Hakala J, Juvela S, *et al.* Safety of low-dose subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after primary intracerebral haemorrhage [J]. *Thromb Res*, 2008, 123(2): 206-212.