

利伐沙班及其拮抗剂对大鼠出血模型的影响

孙双勇, 李亚丽, 郑海娟, 王维亭, 赵专友*

天津市新药安全评价研究中心, 天津 300301

摘要: **目的** 研究利伐沙班的出血副作用, 并对其拮抗剂对大鼠出血模型的影响进行探索。**方法** 大鼠 ig 给予不同剂量利伐沙班 (0.3~30 mg/kg) 1.5 h 后, 根据断尾法测定的出血时间、出血量, 以及凝固法测定的血浆凝血酶原时间 (PT), 观察其出血副作用; 大鼠 ig 给予大剂量利伐沙班 (30 mg/kg) 制备大鼠出血模型, 尾 iv 人凝血酶原复合物或白眉蛇毒血凝酶, 通过测定大鼠断尾出血时间、出血量以及血浆 PT, 观察两种药物对出血作用的拮抗效果。**结果** 大鼠 ig 给予不同剂量的利伐沙班后, 出血时间、出血量、血浆 PT 都明显增加, 与利伐沙班的剂量呈正相关; 人凝血酶原复合物能够显著抑制利伐沙班所致的出血时间、出血量和血浆 PT 的增加, 而白眉蛇毒血凝酶对上述指标无明显影响。**结论** 利伐沙班存在剂量相关性的出血副作用, 在出血严重时, 可采用人凝血酶原复合物作为拮抗剂进行治疗。

关键词: 利伐沙班; 出血副作用; 人凝血酶原复合物; 拮抗剂

中图分类号: R965; R973 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)11-1214-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.101.005

Effects of rivaroxaban and its antagonists on hemorrhage model in rats

SUN Shuang-yong, LI Ya-li, ZHENG Hai-juan, WANG Wei-ting, ZHAO Zhuan-you

Tianjin Center for New Drug Safety Assessment and Research, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To study the bleeding side effect of rivaroxaban and explore its antagonists on hemorrhage model in rats. **Methods** In the bleeding side effect experiment, rats were ig administered with different doses (0.3 — 30 mg/kg) of rivaroxaban. Bleeding time and blood loss were determined by tail cutting method, and plasma prothrombin time (PT) was measured by Kit method 1.5 h after administration. In the antagonist exploration experiment, hemorrhage rat model was established by ig administration of large dosage (30 mg/kg) of rivaroxaban. Human prothrombin complex and hemocoagulase were given by iv injection and their antagonistic effect was observed by measuring the bleeding time, blood loss, and plasma PT. **Results** Bleeding time, blood loss, and plasma PT of rats increased significantly after administration of different doses of rivaroxaban, which were positively correlated with the dose of drug. Human prothrombin complex concentrate could weaken the increase of bleeding time, blood loss, and plasma PT, while hemocoagulase had no significant effect on these indicators. **Conclusion** Rivaroxaban has dose-dependent side effect of bleeding, and human prothrombin complex can alleviate this side effect when severe bleeding happens.

Key words: rivaroxaban; bleeding side effect; human prothrombin complex; antagonists

凝血因子 Xa (Factor Xa, FXa) 是抗凝级联反应中的关键调节子, 可促进血栓形成, 近年来口服 FXa 抑制剂已经成为抗凝药物研究的热点。目前临床上已经应用的口服 FXa 抑制剂有利伐沙班、阿哌沙班、达瑞沙班等^[1]。其中开发最早、最具有代表性的是利伐沙班, 它由拜耳制药公司和强生公司联合开发, 2009 年开始在国内正式使用。利伐沙班已

广泛用于防治各种急、慢性血栓栓塞性疾病^[2-3]。尽管利伐沙班与传统口服抗凝药比较疗效接近, 但是仍然存在着严重的出血副作用。对于该类药物目前尚无特异性拮抗剂, 一旦服用此类药物过多或在正常服用过程中发生出血事件, 医师们将束手无策, 为该类药物的使用带来极大的隐患^[4-5]。本实验采用大鼠断尾法测定出血时间和出血量, 观察利伐沙班

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划青年项目 (14JQCNC13300)

作者简介: 孙双勇, 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

*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

的出血副作用,并选用目前已有的抗凝药物非特异性拮抗剂人凝血酶原复合物和白眉蛇毒血凝酶对利伐沙班的拮抗效果进行了探讨,以期为临床应用提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 药物与试剂

利伐沙班由天津药物研究院药物创新研究中心提供,批号 Y-121127,白色粉末,经高效液相色谱法测定质量分数为 99.5%,给药时使用聚乙二醇 400-乙醇-水(3:1:1)溶解至所需浓度。凝血酶原时间(prothrombin time, PT)测定试剂盒,法国 Stago 公司产品,批号 109317;总蛋白检测试剂盒,宁波康美生物科技股份有限公司产品,批号 110991;注射用白眉蛇毒血凝酶,商品名邦亭,锦州奥鸿药业有限责任公司生产,规格 1 kU,批号 20130117;人凝血酶原复合物,商品名康舒宁,华兰生物工程股份有限公司生产,规格 200 U,批号 201305033。

1.2 动物

Wistar 大鼠,SPF 级,雌雄兼用,体质量 250~300 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物生产许可证号 SCXK(京)2012-0001。

1.3 仪器

多功能全波长酶标仪,美国 Thermo 公司产品;LG-PABER 型凝血因子分析仪,北京世帝科学仪器公司产品。

2 方法

2.1 利伐沙班对大鼠断尾出血时间、出血量及血浆 PT 的影响

Wistar 大鼠,雌雄各半,按体质量随机分为 6 组,即对照组和 5 个利伐沙班给药组,每组 10 只。利伐沙班组 ig 给予利伐沙班,剂量分别为 0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 mg/kg,对照组 ig 给予等体积的溶剂,给药体积均为 1 mL/100 g 体质量。大鼠给药 1.5 h 后,采用断尾法测定出血时间和出血量,即大鼠尾部清洗消毒后,在距尾尖部 5 mm 处切断鼠尾,然后将创面置于 1 mL 37 °C 水浴生理盐水中,记录从断尾部到停止流血的时间,即为出血时间;通过比色法测定生理盐水中蛋白量,计算大鼠出血量。出血时间测定 1.5 h 后,大鼠经腹主动脉采血,使用 3.8%枸橼酸钠按全血与抗凝剂比例 9:1 抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,取血浆,采用凝固法测定

血浆 PT。

2.2 拮抗剂对利伐沙班所致大鼠断尾出血时间、出血量及血浆 PT 的影响

Wistar 大鼠,雌雄各半,按体质量随机分为 4 组,即对照组、模型组、2 个拮抗剂人凝血酶原复合物组和白眉蛇毒血凝酶组。每组 10 只,对照组大鼠 ig 给予等体积的溶剂,其余 3 组均 ig 给予大剂量的利伐沙班(30 mg/kg)。利伐沙班给药 1 h 后,对照组和模型组大鼠均尾 iv 给予等体积的生理盐水,人凝血酶原复合物组大鼠尾 iv 60 U/kg 人凝血酶原复合物,白眉蛇毒血凝酶组大鼠尾 iv 0.2 kU/kg 白眉蛇毒血凝酶,给药体积均为 0.1 mL/100 g 体质量。大鼠给予拮抗剂 0.5 h 后,通过断尾法测定大鼠出血时间和出血量,出血时间测定 1.5 h 后腹主动脉采血,3.8%枸橼酸钠按全血与抗凝剂比例 9:1 抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,取血浆,凝固法测定血浆 PT。

2.3 统计学分析

实验数据计量资料用 SPSS 10.0 软件统计,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 *t* 检验比较各组间均数差异的显著性意义。

3 结果

3.1 利伐沙班对大鼠断尾出血时间和出血量的影响

大鼠 ig 给予利伐沙班后,断尾出血时间明显延长,并有明显的量效关系。与对照组比较,0.3、1、3、10、30 mg/kg 利伐沙班组出血时间分别延长了 12.9%、35.6% ($P < 0.05$)、70.2% ($P < 0.01$)、111.9% ($P < 0.01$)、130.3% ($P < 0.001$)。以对照组大鼠出血时间为 100%,计算各剂量组对出血时间的增长率,经拟合得线性方程 $Y = 62.2 \lg X + 41.9$, $r = 0.99$,进而计算得利伐沙班使出血时间延长 1 倍的剂量 (ED_{200}) 为 8.6 mg/kg。

对照组大鼠的出血量均值为 32.5 μ L,给予利伐沙班后,出血量显著增加,并呈现量效关系。与对照组比较,0.3、1、3、10、30 mg/kg 利伐沙班组出血量分别增加了 2.8%、11.1%、25.5%、49.8% ($P < 0.05$)、70.5% ($P < 0.01$)。以对照组大鼠出血量为 100%,计算各剂量组对出血量的增长率,经拟合得线性方程 $Y = 34.8 \lg X + 15.0$, $r = 0.98$,进而计算得利伐沙班使出血量增加 50%的剂量 (ED_{150}) 为 10.1 mg/kg。结果见表 1。

表 1 不同剂量利伐沙班对大鼠断尾出血时间和出血量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Effect of different doses of rivaroxaban on bleeding time and blood loss in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	出血时间/s	出血时间延长率/%	出血量/ μ L	出血量增长率/%
对照	—	1 574.0 \pm 448.0	—	32.5 \pm 10.8	—
利伐沙班	0.3	1 777.4 \pm 546.5	12.9	33.4 \pm 8.7	2.8
	1.0	2 133.6 \pm 596.9*	35.6	36.1 \pm 7.9	11.1
	3.0	2 678.6 \pm 828.8**	70.2	40.8 \pm 17.9	25.5
	10	3 335.6 \pm 1 358.0**	111.9	48.7 \pm 14.8*	49.8
	30	3 625.7 \pm 1 286.1***	130.3	55.4 \pm 16.2**	70.5

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

3.2 利伐沙班对大鼠血浆 PT 的影响

大鼠 ig 给予利伐沙班后, 血浆 PT 明显延长, 与溶对照组比较, 0.3、1.0、3.0、10、30 mg/kg 利伐沙班组可使 PT 分别延长了 18.4%、41.9% ($P<0.01$)、79.9% ($P<0.05$)、234.1% ($P<0.001$)、329.6%

($P<0.001$)。以对照组大鼠的血浆 PT 为 100%, 计算各剂量组对 PT 的增长率, 经拟合得线性方程 $Y=162.8 \lg X+61.6$, $r=0.95$, 进而计算得利伐沙班使 PT 增加 1 倍的剂量 (ED_{200}) 为 1.7 mg/kg。结果见表 2。

表 2 不同剂量利伐沙班对大鼠血浆 PT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Effect of different doses of rivaroxaban on plasma PT in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PT/s	PT 增长率/%
对照	—	17.9 \pm 2.2	—
利伐沙班	0.3	21.2 \pm 5.7	18.4
	1.0	25.4 \pm 4.8**	41.9
	3.0	32.2 \pm 8.5***	79.9
	10	59.8 \pm 13.0***	234.1
	30	76.9 \pm 15.5***	329.6

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

3.3 拮抗剂对利伐沙班所致大鼠出血时间和出血量的影响

对照组大鼠断尾出血时间为 1 489.8 s, 大鼠 ig 给予大剂量利伐沙班 (30 mg/kg) 后, 断尾出血时间明显延长, 平均为 3 507.1 s, 与对照组比较延长了 135.4% ($P<0.001$); 尾 iv 人凝血酶原复合物 (60 U/kg) 后, 断尾出血时间显著降低, 为 1 737.0 s, 抑制率为 87.7% ($P<0.001$); 大鼠尾 iv 白眉蛇毒血凝酶后, 断尾出血时间有所降低, 但与模型组比较差异无统计学意义。

与出血时间相似, 大鼠 ig 给予大剂量利伐沙班 (30 mg/kg) 后, 断尾出血量显著增加, 与对照组比

较增加了 80.7% ($P<0.001$); 尾 iv 人凝血酶原复合物后, 出血量明显减少, 减少了 89.7% ($P<0.001$); 大鼠尾 iv 白眉蛇毒血凝酶后, 出血量有所减少, 但与模型组比较差异无统计学意义。结果见表 3。

3.4 拮抗剂对利伐沙班所致大鼠血浆 PT 的影响

对照组大鼠 PT 为 17.6 s, 大鼠 ig 给予利伐沙班后, PT 明显延长, 平均为 81.6 s, 与对照组比较延长了 363.6% ($P<0.001$); 大鼠尾 iv 人凝血酶原复合物后, PT 延长显著降低, 平均为 36.9 s, 抑制了 69.8% ($P<0.001$); iv 白眉蛇毒血凝酶后, PT 有所降低, 但与模型组比较差异无统计学意义。结果见表 4。

表 3 拮抗剂对利伐沙班所致大鼠断尾出血时间和出血量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of antagonists on bleeding time and blood loss in rats induced by rivaroxaban ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂 量	出血时间/s	出血时间变化率/%	出血量/ μ L	出血量变化率/%
对照	—	1 489.8 \pm 241.7	—	30.1 \pm 6.1	—
模型	—	3 507.1 \pm 1135.5 ^{***}	135.4 ^a	54.4 \pm 16.9 ^{***}	80.7 ^a
人凝血酶原复合物	60 U \cdot kg ⁻¹	1 737.0 \pm 498.2 ^{###}	87.7 ^b	32.6 \pm 9.4 ^{###}	89.7 ^b
白眉蛇毒血凝酶	0.2 kU \cdot kg ⁻¹	2 855.8 \pm 1056.5	32.3 ^b	46.6 \pm 17.9	32.1 ^b

与对照组比较: ^{***} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{###} $P < 0.001$; a、b 分别表示与对照组、模型组比较

^{***} $P < 0.001$ vs control group; ^{###} $P < 0.001$ vs model group; a, b indicated comparison with control group and model group, respectively

表 4 拮抗剂对利伐沙班所致大鼠血浆 PT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of antagonists on plasma PT in rats in rats induced by rivaroxaban ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	剂 量	PT/s	PT 变化率/%
对照	—	17.6 \pm 1.1	—
模型	—	81.6 \pm 15.5 ^{***}	363.6 ^a
人凝血酶原复合物	60 U \cdot kg ⁻¹	36.9 \pm 10.9 ^{###}	69.8 ^b
白眉蛇毒血凝酶	0.2 kU \cdot kg ⁻¹	73.0 \pm 9.8	13.4 ^b

与对照组比较: ^{***} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{###} $P < 0.001$; a、b 分别表示与对照组、模型组比较

^{***} $P < 0.001$ vs control group; ^{###} $P < 0.001$ vs model group; a, b indicated comparison with control group and model group, respectively

4 讨论

利伐沙班作为一种疗效确切的抗凝药物,它与传统抗凝药物相似,在使用过程中最常见的副作用就是大出血^[6]。据统计,在利伐沙班用于全膝关节、髋关节置换术后深静脉血栓的预防、深静脉血栓和肺栓塞的治疗、房颤患者缺血性脑卒中的预防和急性冠脉综合症的二级预防中,大出血发生率分别为 1.2%、0.8%、5.6%、1.4%^[7-8]。一方面利伐沙班使用过程中出血事件频发,另一方面此类药物正逐渐取代华法林,成为口服抗凝的一线药物,因此寻找能够在紧急情况下缓解或完全抑制出血作用的药物变得十分必要。针对口服抗凝药物的特异性拮抗剂目前正在研发当中,波托拉制药公司开发的 PRT064445 是第一个证明有效的拮抗剂,此外在研的还有勃林格殷格翰的 aDabi-Fab、Perosphere Inc. 和第一三共株式会社联合开发的 PER977^[9-10]。然而这些药物开发最早的尚在 II 期临床试验中,离大规模临床使用仍有一段时间。因此,从目前已有的抗凝药物拮抗剂中寻找缓解出血症状的药物,不失为一种策略。

本实验通过对大鼠断尾出血时间和出血量的检测,观察了利伐沙班在不同剂量下的出血副作用,结果表明大鼠出血时间和出血量与利伐沙班的给药剂量呈正相关。利伐沙班的临床剂量换算到大鼠等

效剂量为 1 mg/kg,在该剂量下,大鼠出血时间与对照组比较增加了 35.6%,血浆 PT 增加了 41.9%,差异均具有显著性,因此利伐沙班在使用过程中的出血作用是不容忽视的。实验选用临床上已有抗凝药物非特异性拮抗剂人凝血酶原复合物和白眉蛇毒血凝酶,观察它们对利伐沙班所致出血作用的影响。结果显示,在临床推荐剂量下,人凝血酶原复合物能够使大剂量利伐沙班造成的出血时间和出血量大大幅度降低,PT 也有显著逆转。白眉蛇毒血凝酶对利伐沙班造成的出血副作用影响不大。人凝血酶原复合物是由从健康人混合血浆中分离制备的一种能促进血液凝固的静脉注射血浆蛋白制剂,主要包含凝血因子 F II、F VII、F IX、F X,已用于治疗乙型血友病和因维生素 K 缺乏引起的出血症状^[11]。在新型口服抗凝药物尚无特异性拮抗剂的情况下,使用过程中一旦发生大出血等危急情况,可尝试选用人凝血酶原复合物作为利伐沙班的拮抗剂,其在临床使用中的可行性、有效性,以及临床应用方案有待于进一步研究。

参考文献

[1] El Ahmadiéh T Y, Aoun S G, Daou M R, et al. New-generation oral anticoagulants for the prevention of stroke: implications for neurosurgery [J]. *J Clin Neurosci*, 2013, 20(10): 1350-1356.

- [2] Thomas T F, Ganetsky V, Spinler S A. Rivaroxaban: an oral factor Xa inhibitor [J]. *Clin Ther*, 2013, 35(1): 4-27.
- [3] Zhao X, Sun P, Zhou Y, *et al*. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of single/multiple doses of the oral, direct Factor Xa inhibitor rivaroxaban in healthy Chinese subjects [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2009, 68(1): 77-88.
- [4] Sardar P, Chatterjee S, Wu W, *et al*. New oral anticoagulants are not superior to warfarin in secondary prevention of stroke or transient ischemic attacks, but lower the risk of intracranial bleeding: insights from a meta-analysis and indirect treatment comparisons [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77694.
- [5] Eikelboom J W, Weitz J I. Procoagulants for management of bleeding with the new oral anticoagulants [J]. *Thromb Haemost*, 2013, 110(1): 1.
- [6] Lauw M N, Coppens M, Eikelboom J W. Recent advances in antidotes for direct oral anticoagulants: their arrival is imminent [J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(4): 381-384.
- [7] Goodman S G, Wojdyla D M, Piccini J P, *et al*. Factors associated with major bleeding events: insights from the ROCKET AF trial (rivaroxaban once-daily oral direct factor Xa inhibition compared with vitamin K antagonism for prevention of stroke and embolism trial in atrial fibrillation) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(9): 891-900.
- [8] Wasserlauf G, Grandi S M, Filion K B, *et al*. Meta-analysis of rivaroxaban and bleeding risk [J]. *Am J Cardiol*, 2013, 112(3): 454-460.
- [9] Lu G, DeGuzman F R, Hollenbach S J, *et al*. A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa [J]. *Nat Med*, 2013, 19(4): 446-451.
- [10] Schiele F, van Ryn J, Canada K, *et al*. A specific antidote for dabigatran: functional and structural characterization [J]. *Blood*, 2013, 121(18): 3554-3562.
- [11] Ferreira J, DeLosSantos M. The clinical use of prothrombin complex concentrate [J]. *J Emerg Med*, 2013, 44(6): 1201-1210.