

多肽衍生物 LX2416 抗血栓形成作用研究

王 颖¹, 沈砚青², 杨 伟², 罗跃娥¹

1. 天津医学高等专科学校 药学教研室, 天津 300222

2. 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300301

摘要: **目的** 研究多肽衍生物 LX2416 的抗血栓形成作用。**方法** 通过凝血酶原时间(PT)、部分活化凝血酶原时间(APTT)测定, 考察 LX2416 对凝血系统的影响。通过二磷酸腺苷(ADP)诱导的体外血小板聚集实验, 考察 LX2416 的抗血小板聚集作用。采用 SD 大鼠随机分为对照组、替罗非班(1.0 mg/kg)组、LX2416(0.3、1.0、3.0 mg/kg)组, 通过动静脉旁路血栓模型, 考察 LX2416 体内的抗血栓作用。采用 ICR 小鼠随机分为对照组、替罗非班(1 mg/kg)组、LX2416(1、3、10 mg/kg)组, 通过出血毒性实验, 考察 LX2416 的出血风险。**结果** LX2416 对 PT、APTT 无显著性影响, 能够抑制 ADP 诱导的体外血小板聚集和大鼠动静脉旁路血栓形成, 呈剂量相关性。LX2416 具有一定的出血风险, 但比替罗非班出血风险要低。**结论** LX2416 通过抑制血小板聚集, 具有良好的抗血栓形成作用, 并且出血风险较低。

关键词: LX2416; 抗血栓形成; 抗血小板聚集; 出血风险

中图分类号: R963 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)08-1416-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.08.005

Antithrombotic effect of polypeptide derivative LX2416

WANG Ying¹, SHEN Yan-qing², YANG Wei², LUO Yue-e¹

1. Department of Pharmacy, Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China

2. TPIR Pharmaceutical Co., Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To study the antithrombotic effect of polypeptide derivative LX2416. **Methods** Effect of LX2416 on coagulation system was evaluated by PT/APTT assay. Effect of LX2416 on platelet aggregation was observed by the platelet aggregation assay induced by ADP *in vitro*. SD rats were randomly divided into control group, tirofiban (1.0 mg/kg) group, and LX2416 (0.3, 1.0, and 3.0 mg/kg) groups, and the antithrombotic effect of LX2416 was evaluated by the model of arteriovenous shunt thrombosis. ICR mice were randomly divided into control group, tirofiban (1 mg/kg) group and LX2416 (1, 3, and 10 mg/kg) groups. The bleeding risk of LX2416 was evaluated by bleeding toxicity assay. **Results** LX2416 had no significant effect on PT/APTT, but could inhibit the platelet aggregation induced by ADP *in vitro* and the thrombus formation in rats in a dose-dependent manner. Compared with tirofiban, LX2416 had lower bleeding risk. **Conclusion** LX2416 has good antithrombotic effect by inhibiting platelet aggregation with low bleeding risk.

Key words: LX2416; antithrombosis; antiplatelet aggregation; bleeding risk

近年来心血管疾病的发病率和致死率居高不下, 而动脉粥样硬化血栓是血管阻塞性脑病和缺血性心脏病等心血管疾病发生的主要原因^[1]。因此开发抗血栓药物成为当前治疗心血管疾病药物研究领域的重要方向之一。

众多研究表明, 蛇毒具有良好的抗血栓形成作用^[2]。蛇毒中存在多种多肽类活性物质, 从蛇毒中分离纯化活性多肽为研究新型抗血栓药物提供了思

路。自尖吻蝮蛇毒中分离得到的天然三肽 AAP (焦谷氨酸-天冬酰胺-色氨酸, 图 1) 具有良好的抗血栓形成作用^[3]。但进一步研究表明, 由于 AAP 属于三肽, 化学结构不稳定。为此, 本课题组对 AAP 进行结构改造, 合成多种 AAP 衍生物, 并从中筛选出了一种活性较高的新化合物 LX2416 (图 1)。本实验考察了 LX2416 的抗血栓形成活性, 为探究其作用机制提供了参考。

收稿日期: 2017-03-27

作者简介: 王 颖 (1988—), 女, 黑龙江人, 硕士, 助教, 研究方向为药理学。Tel: (022)60276618 E-mail: 570265696@qq.com

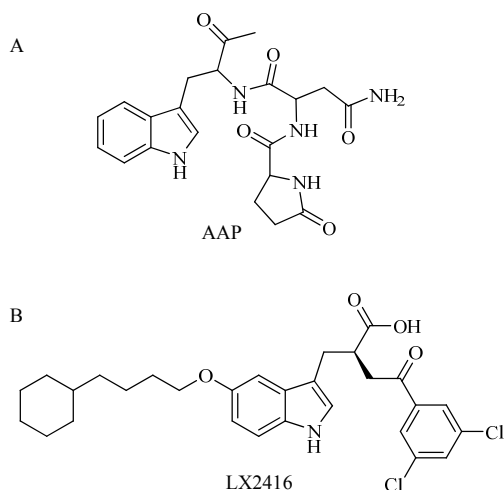


图 1 AAP (A) 和 LX2416 (B) 的化学结构
Fig. 1 Chemical structure of AAA (A) and LX2416 (B)

1 材料

1.1 药物与试剂

LX2416 (中国药科大学药学院提供, 质量分数 99.9%, 批号 20130101), 替罗非班 (中国药科大学药学院提供, 质量分数 99.9%, 批号 20120701); 凝血酶原时间 (PT) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 编号 F007); 部分活化凝血酶原时间 (APTT) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 编号 F008-1) 二磷酸腺苷 (ADP, 美国 Sigma 公司, 编号 A2754)。其他常用试剂均为市售分析纯。

1.2 实验仪器

LG-PABER-1 全自动凝血仪 (北京中勤世帝科学仪器有限公司); PRECIL BY-NJ4 血小板聚集仪 (北京普利生仪器有限公司); AL104 电子天平 (METTLER TOLEDO)。

1.3 实验动物

雄性新西兰兔, 体质量 2.5 ± 0.5 kg; SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量 180~220 g; SPF 级 ICR 小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 由南京青龙山动物繁殖场提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2017-0001。实验期间自由饮食和饮水。

2 方法

2.1 PT 和 APTT 的测定

2.1.1 动物分组与给药 30 只 ICR 小鼠按随机数字表随机分为对照组、肝素 (5 mg/kg) 组和 LX2416 (1、3、10 mg/kg) 组, 每组 6 只。尾 iv 给药 1 次, 给药体积 5 mL/kg。肝素、LX2416 的给药剂量依据课题组预实验结果所得。

2.1.2 贫血小板血浆 (PPP) 的制备 给药 15 min 后, 小鼠眼眶取血。加 3.8% 枸橼酸钠溶液 (1:9 抗凝), 混匀后 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 即得。

2.1.3 PT 的测定 取 50 μ L PPP 置凝血仪测试杯中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后加入 100 μ L PT 溶液, 记录纤维蛋白形成时间。

2.1.4 APTT 的测定 取 50 μ L PPP 置凝血仪测试杯中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后加入 50 μ L APPT 溶液, 5 min 后加入 50 μ L 25 mmol/L CaCl_2 , 记录纤维蛋白形成时间。

2.2 ADP 诱导体外血小板聚集实验

新西兰兔麻醉后分离颈动脉插管, 取血, 3.8% 枸橼酸钠溶液 (1:9 抗凝)。1 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 得富血小板血浆 (PRP), 剩余部分 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 得贫血小板血浆 (PPP)。以 PPP 稀释 PRP 至血小板数为 $(200 \sim 250) \times 10^9$ /L。依据 Born 氏比浊法, 血小板聚集仪预热至 37 $^{\circ}$ C, 300 μ L PPP 调零。取 270 μ L PRP 加 20 μ L 待测样品至测试杯中, 孵育 5 min 后, 加 10 μ L ADP (终浓度 10 μ mol/L) 诱导剂, 以替罗非班 (100 μ mol/L) 为阳性对照, 含 0.5% DMSO 的生理盐水为对照, 测定 5 min 内血小板最大聚集率, 考察 LX2416 (30、100、300 μ mol/L) 对 ADP 诱导的血小板聚集的抑制作用。

血小板聚集抑制率 = (对照组最大聚集率 - 给药组最大聚集率) / 对照组最大聚集率

2.3 动静脉旁路血栓模型

2.3.1 动物分组与给药 30 只 SD 大鼠采用随机数字表随机分为对照组、替罗非班 (1.0 mg/kg) 组和 LX2416 (0.3、1.0、3.0 mg/kg) 组, 每组 6 只。尾 iv 给药 1 次, 给药体积 5 mL/kg。替罗非班、LX2416 的给药剂量依据课题组预实验结果并参考临床用量按大鼠体表面积折算所得。

2.3.2 动静脉旁路血栓模型的制备 取 1 根 12 cm 长 PE-160 管, 内置 10 cm 长棉线 (预先称量干质量和湿质量) 后与 2 根 4 cm 长 PE-60 管组成套管, 注入生理盐水浸润。大鼠给药 15 min 后, ip 10% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉。颈部正中切口, 分离右侧颈总动脉和左侧颈外静脉, 分别切口后插入套管固定, 注入肝素生理盐水, 松开动脉夹, 血液循环 20 min, 取出棉线称量湿质量, 置 60 $^{\circ}$ C 干燥 20 min 后称量干质量。分别减去预先测量的棉线湿质量和干质量

得血栓湿质量和干质量，计算血栓形成抑制率。

血栓形成抑制率 = (对照组血栓质量 - 给药组血栓质量) / 对照组血栓质量

2.4 出血毒性实验

2.4.1 动物分组和给药 50 只 ICR 小鼠采用随机数字表随机分为对照组，替罗非班 (1 mg/kg) 组、LX2416 (1、3、10 mg/kg) 组，每组 10 只。尾 iv 给药 1 次，给药体积 5 mL/kg。替罗非班、LX2416 的给药剂量依据课题组预实验结果并参考临床用量按小鼠体表面积折算所得。

2.4.2 出血时间测定 小鼠给药 15 min 后，腹腔注射 5% 水合氯醛 6 mL/kg 麻醉。小鼠置于固定器中，尾部穿出固定器小孔，自尾尖剪去 3 mm 后浸入 40 mL 37 °C 生理盐水中，记录出血时间。如出血时间大于 20 min，则记为 20 min。

2.5 统计学处理

采用 GraphPad Prism 6.01 软件处理各组数据，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析和 Dunnett's 检验。

3 结果

3.1 LX2416 对小鼠 PT、APTT 的影响

与对照组比较，LX2416 1、3、10 mg/kg 对 PT、APTT 均无统计学差异。即使选择更高浓度进行实验，LX2416 对 PT、APTT 也无显著性影响，见表 1。

3.2 LX2416 对 ADP 诱导体外血小板聚集的影响

与对照组比较，LX2416 (30、100、300 $\mu\text{mol/L}$) 都能极其显著地抑制体外血小板聚集 ($P < 0.001$)，呈剂量相关性，提示 LX2416 有显著的体外血小板聚集抑制作用，但仍弱于替罗非班，LX2416 对 ADP 诱导体外血小板聚集的影响见表 2。

表 1 LX2416 对小鼠 PT、APTT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of LX2416 on PT and APTT of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PT/s	APTT/s
对照	—	17.3 ± 0.6	20.6 ± 0.4
肝素	5	>60***	>60***
LX2416	1	18.2 ± 0.8	20.3 ± 0.4
	3	17.6 ± 0.4	19.9 ± 0.6
	10	17.3 ± 0.5	20.2 ± 0.6

与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

表 2 LX2416 对体外血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of LX2416 on platelet aggregation ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	血小板聚集率/%
对照	—	90.5 ± 3.1
替罗非班	100	19.9 ± 2.2***
LX2416	30	51.1 ± 1.5***
	100	45.8 ± 1.5***
	300	33.3 ± 0.8***

与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

3.3 LX2416 对大鼠动静脉旁路血栓形成的影响

与对照组比较，LX2416 (0.3 mg/kg) 组血栓干质量、湿质量有所降低，但并无统计学差异。LX2416 (1.0、3.0 mg/kg) 组能显著抑制大鼠动静脉旁路血栓的形成 ($P < 0.001$)。提示 LX2416 对大鼠动静脉旁路血栓形成的抑制作用呈剂量相关性，LX2416 对大鼠动静脉旁路血栓形成的影响见表 3。

表 3 LX2416 对大鼠动静脉旁路血栓形成影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of LX2416 on the formation of arteriovenous shunt thrombosis in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	干血栓形成		湿血栓形成	
		干质量/mg	抑制率/%	湿质量/mg	抑制率/%
对照	—	5.6 ± 0.2	—	22.5 ± 0.5	—
替罗非班	1.0	2.4 ± 0.2***	57.31	13.9 ± 0.5***	38.42
LX2416	0.3	5.1 ± 0.1	8.36	21.1 ± 0.4	6.29
	1.0	3.4 ± 0.2***	38.21	16.6 ± 0.3***	26.42
	3.0	2.2 ± 0.1***	60.30	13.1 ± 0.2***	41.67

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

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

3.4 LX2416 对出血时间的影响

与对照组比较, LX2416 (1、3、10 mg/kg) 组出血时间显著增加 ($P < 0.05$)。替罗非班 (1 mg/kg) 组出血时间较长, 部分小鼠到 20 min 出血仍未停止, 记为 20 min。提示 LX2416 虽然具有一定的出血风险, 但比替罗非班出血风险要低, 结果见表 4。

表 4 LX2416 对小鼠出血时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 4 Effect of LX2416 on bleeding time in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	出血时间/min
对照		9.7±0.8
替罗非班	1	16.6±1.1****
LX2416	1	12.1±0.6*
	3	12.5±0.7*
	10	13.2±1.0*

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

4 讨论

血栓形成是心脑血管疾病的主要诱因。凝血/抗凝血系统、血小板、纤溶系统在血栓形成过程中发挥着重要作用。正常血管中各系统之间相互制约, 作用相对平衡, 不易形成血栓^[4]。但一些因素改变后, 如血管内皮损伤, 凝血/抗凝血系统、血小板、纤溶系统之间的平衡被打破, 最终导致血栓形成, 诱发各类心脑血管疾病^[5-7]。蛇毒中含有多种生物活性蛋白和多肽类化合物, 广泛作用于血液凝固, 血小板聚集、黏附、释放及溶栓等, 具有良好的开发前景^[2]。本研究对蛇毒三肽化合物 AAP 进行结构改造, 并通过 PT、APTT 测定, 体外血小板聚集实验, 动静脉旁路血栓模型和小鼠出血毒性实验对新合成化合物 LX2416 的抗血栓形成作用进行了评估。

PT、APTT 测定是外源性和内源性凝血系统最为常用的筛选实验。结果表明, LX2416 对 PT、APTT 并无显著性影响。提示 LX2416 的抗血栓活性并非作用于凝血系统。使用抗血小板聚集实验进一步研究表明, LX2416 能够剂量相关性地抑制 ADP 诱导的血小板聚集。由此可以确定 LX2416 的抗血栓活性主要是通过抑制血小板的活性来实现。观察不同剂量的 LX2416 对大鼠动静脉旁路血栓模型的影响, 结果表明 LX2416 (1.0、3.0 mg/kg) 组静脉给药时能有效抑制血栓形成, 血栓湿质量和干质量与

对照组差异有显著性, 并且这种抑制作用呈剂量相关性。本研究从体外和体内水平上都证实了 LX2416 的抗血栓形成作用, 为进一步探索 LX2416 的作用机制和临床前研究提供了参考。

目前上市的抗血小板药物大部分都具有一定的出血风险, 其临床应用受到严密监控^[8-10]。特别是 GbIIb/IIIa 受体拮抗剂, 如替罗非班, 虽然具有很强的抗血小板聚集作用, 但出血风险相对其他作用机制的血小板聚集药物更高。因此限制了这类药物的临床应用。与替罗非班比较, 在治疗剂量下, LX2416 的出现风险明显低于替罗非班, 这预示着 LX2416 具有潜在的临床应用价值。同时, 其出血毒性降低的机制有待进一步研究, 将为后续抗血小板聚集药物的开发提供参考。

综上所述, LX2416 通过剂量相关性地抑制血小板聚集, 能够显著抑制血栓形成, 并表现出了较低的出血风险。进一步研究其作用机制与出血风险之间关系, 有助于新型抗血小板聚集药物的开发。

参考文献

- [1] 葛均波, 张友恩, 姚康. 炎症在动脉粥样硬化血栓形成疾病中的作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12): 1589-1592.
- [2] Hutton R A, Warrell D A. Action of snake venom components on the haemostatic system [J]. *Blood Rev*, 1993, 7(3): 176-189.
- [3] Kong Y, Huo J L, Xu W, et al. A novel anti-platelet aggregation tripeptide from *Agkistrodon acutus* venom: isolation and characterization [J]. *Toxicon*, 2009, 54(2): 103-109.
- [4] Topol E J, Yadav J S. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease [J]. *Circulation*, 2000, 101(5): 570-580.
- [5] Furie B, Furie B C. Mechanisms of thrombus formation [J]. *New Engl J Med*, 2008, 359(9): 938-949.
- [6] McNicol A, Israels S J. Platelets and anti-platelet therapy [J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 93(4): 381-396.
- [7] Jurk K, Jahn U R, Van Aken H, et al. Platelets in patients with acute ischemic stroke are exhausted and refractory to thrombin, due to cleavage of the seven-transmembrane thrombin receptor (PAR-1) [J]. *Thromb Haemost*, 2004, 91(2): 334-344.

- [8] King S, Short M, Harmon C. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: the resurgence of tirofiban [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 78: 10-16.
- [9] Goh C, Churilov L, Mitchell P, *et al*. Clopidogrel hyper-response and bleeding risk in neurointerventional procedures [J]. *Ajnr Am J Neuroradiol*, 2013, 34(4): 721-726.
- [10] Fletcher E H, Johnston D E, Fisher C R, *et al*. Systematic review: Helicobacter pylori and the risk of upper gastrointestinal bleeding risk in patients taking aspirin [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010, 32(7): 831-839.