

· 药理实验与临床观察 ·

重组水蛭素体内抗凝活性的实验研究

吕 莉¹,李欣燕¹,韩国柱^{1*},汪和睦²

(1. 大连医科大学 药理教研室,辽宁 大连 116027; 2 南开大学 生物物理教研室,天津 300072)

摘 要:目的 研究重组水蛭素的抗凝活性,为水蛭素新药开发提供实验依据。方法 家兔 iv 重组水蛭素前及后心脏采血,应用血凝仪测定凝血酶时间 (TT)、凝血酶原时间 (PT) 和活化的部分凝血活酶时间 (APTT),并考察其抗凝活性的量效和时效关系。结果 重组水蛭素能明显延长 TT 和 APTT,且呈剂量依赖性,但在所试剂量范围内对 PT 无明显影响;其延长 TT 和 APTT 的作用随时间而下降,作用持续时间约 60 min。结论 重组水蛭素具有明显抗凝作用,明显强于现有抗凝药肝素,且其作用强度与同剂量德国产基因重组水蛭素 Refludan 相同。

关键词:水蛭素;基因重组水蛭素;抗凝;凝血酶时间;凝血酶原时间;活化的部分凝血活酶时间

中图分类号: R286.32 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)06-0520-03

Experimental studies on *in vivo* anticoagulant activity of recombinant hirudin in rabbits

LÜ Li¹, LIXin-yan¹, HAN Guo-zhu¹, WANG He-mu²

(1. Department of Pharmacology, Dalian University of Medical Sciences, Dalian Liaoning, 116027, China;

2. Department of Biophysics, Nankai University, Tianjin 300072, China)

Abstract **Object** To study the anticoagulant activity of recombinant hirudin (rH) made in China and to provide the experimental basis for the development of hirudin. **Methods** Thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) were determined by coagulometer for rabbit blood samples collected before and after iv rH. The percent of lengthening above coagulation time parameters was calculated and used to investigate the dose- and time-effect relationship of rH. **Results** The TT and APTT were prolonged remarkably by rh, while PT not within the test range, in a dose-dependent manner, and the action duration was about 60 min. **Conclusion** Domestic rH (*N*-Ile¹-Thr²-r-hirudin) has obvious anticoagulant effects. Its potency is much higher than heparin, and identical to that of Refludan (*N*-Leu¹-r-hirudin), which was an authorized rH product made in Germany.

Key words hirudin; recombinant hirudin (rH); antithrombotic effect; thrombin time (TT); prothrombin time (PT); activated partial thromboplastin time (APTT)

水蛭素 (hirudin) 是活血化瘀中药水蛭的唾液腺分泌的一种由 65 个氨基酸组成的酸性多肽,是高度特异的凝血酶抑制剂^[1,2]。对多种血栓性疾病如静脉血栓、弥散性血管内凝血、脑栓塞、血栓性静脉炎及冠状动脉血栓都有预防和治疗效果,特别是对外科手术后及栓塞治疗后的再栓塞有重要的预防和治疗效果^[3-5]。目前国内外采用基因重组技术研制水蛭素取得了令人瞩目的进展。国内有关单位采用甲基营养型汉逊酵母真核表达系统研制出的重组水蛭素 (r-hirudin, rH) 为国内外首创,与天然水蛭素 I

型 (*N* 端为 Val¹-Val²) 不同之处除 rH-63 位酪氨酸脱硫酸基外,*N* 末端为 *N*-Ile¹-Thr²型,与欧美等国研制的重组水蛭素在 *N* 末端的 1, 2 位有所不同。本文研究了此种 rH 对家兔凝血时间参数的影响,旨在了解 rH 的体内抗凝活性,为水蛭素新药开发提供实验依据。

1 材料

1.1 药物: 重组水蛭素 (r-hirudin, rH), 大连高新生物制药公司研制,批号 990501; 肝素钠 (heparin), 上海生物化学制品厂产品,批号 870516。

* 收稿日期: 2002-01-03

基金项目: 国家“九五”科技攻关计划资金资助 (96-C02-01-05 A)

作者简介: 吕莉 (1972-), 天津市人, 第四军医大学附属吉林军医学院药理教研室, 助教, 从事药理教学与研究, 现为大连医科大学在读硕士研究生, 发表论文 3 篇。

* 通讯作者 E-mail hgzhmy3@mail.dlptt.ln.cn

Refludan (注射用 r-DNA Lepirudin, 即 $N\text{-Leu}^1\text{-Thr}^2\text{-r-hirudin}$), 德国 Hoechst 公司的重组水蛭素产品, 批号 97035004

1.2 试剂: 凝血酶, 天津血液研究所产品, 批号 9810; 凝血活酶, 美国 Behring 公司产品, 批号 TPC-426; 活化的部分凝血活酶试剂, 美国 IL 公司产品, 批号 N 1075650; 枸橼酸钠, 浙江杭州萧山化学试剂厂产品, 批号 910527

1.3 动物: 大耳白兔, 雄性, 体重 2.0~2.5 kg, 由大连医科大学动物中心提供 (合格证号: 辽实动字第 022 号)。

1.4 仪器: CA-100 型血凝分析仪, 日本 Sysmax 医用电子仪器有限公司。

2 方法

2.1 量效关系: 家兔 36 只, 随机均分 6 组: rH 100, 50, 25 和 12.5 $\mu\text{g/kg}$ 组, 阳性对照药肝素 50 $\mu\text{g/kg}$ 组以及强度对比药 Refludan 50 $\mu\text{g/kg}$ 组。家兔经耳缘 iv 药物前及后 5 min 自心脏取血 1.2 mL, 以 3.8% 枸橼酸钠抗凝 (9:1), 混合后以 1500 r/min 离心 5 min, 分取血浆, 应用血凝仪按文献^[6,7]方法测定凝血酶时间 (Thrombin Clot Time, TT)、凝血酶原时间 (Prothrombin Time,

PT) 和活化的部分凝血活酶时间 (Activated Partial Thromboplastin Time, APTT)。TT 测定中, 如超过 120 s 或不凝则按 120 s 计^[6]。比较给药前后各血凝时间参数的变化, 从而了解 rH 的抗凝作用。

2.2 时效关系: 家兔 12 只, 随机均分 2 组: 给药组 iv 国产 rH 50 $\mu\text{g/kg}$, 对照组 iv 等容量生理盐水。家兔经耳缘 iv 药物前和后 5, 15, 30, 60, 120 及 240 min 分别自心脏采血, 同上法测定 TT、PT 和 APTT。

3 结果

3.1 量效关系: 如表 1 所示。家兔 iv 上述 4 种不同剂量的国产 rH 后除 PT 无明显变化外, TT 和 APTT 均明显延长, 并呈明显剂量依赖关系。剂量由高到低 TT 延长分别为 857.70%、435.61%、32.35% ($P < 0.01$) 和 16.63% ($P > 0.05$), APTT 延长分别为 221.15%、110.69%、66.03% 和 30.44% ($P < 0.01$), PT 延长分别为 0.53%、3.02%、-2.17% 和 3.10% ($P > 0.05$)。肝素、Refludan iv 50 $\mu\text{g/kg}$ 后 TT、APTT 和 PT 分别延长 37.35%、50.35% ($P < 0.01$) 和 -1.66% ($P > 0.05$) 以及 331.61%、106.74% ($P < 0.01$) 和 -6.38% ($P > 0.05$)。

表 1 iv rH 对家兔血凝时间参数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	TT			PT			APTT		
		给药前 (s)	给药后 5 min (s)	延长 (%)	给药前 (s)	给药后 5 min (s)	延长 (%)	给药前 (s)	给药后 5 min (s)	延长 (%)
rH	100	12.53 $\pm$ 2.01	120.00 $\pm$ 0.00 ^{*△}	857.70	9.05 $\pm$ 1.53	9.10 $\pm$ 1.22	0.55	35.98 $\pm$ 2.24	115.55 $\pm$ 14.81 ^{*△}	221.15
	50	11.15 $\pm$ 1.42	59.72 $\pm$ 47.56 ^{*▲△#}	435.61	9.27 $\pm$ 1.45	9.55 $\pm$ 1.55	3.02	36.58 $\pm$ 1.63	80.73 $\pm$ 6.13 ^{*▲##}	110.69
	25	10.82 $\pm$ 1.57	14.32 $\pm$ 1.92 [*]	32.35	8.28 $\pm$ 1.05	8.10 $\pm$ 1.03	-2.17	36.38 $\pm$ 2.42	60.40 $\pm$ 4.10 [*]	66.03
	12.5	10.93 $\pm$ 2.59	12.75 $\pm$ 3.08	16.65	8.07 $\pm$ 1.15	8.32 $\pm$ 1.17	3.10	34.17 $\pm$ 1.63	44.57 $\pm$ 2.56 [*]	30.44
Refludan	50	16.48 $\pm$ 1.76	71.13 $\pm$ 39.07 ^{*△△}	331.61	8.47 $\pm$ 1.38	7.93 $\pm$ 1.23	-6.38	37.68 $\pm$ 5.52	77.90 $\pm$ 7.35 [*]	106.74
肝素	50	11.38 $\pm$ 0.70	15.63 $\pm$ 2.94 [*]	37.35	8.42 $\pm$ 0.65	8.28 $\pm$ 0.83	-1.66	35.37 $\pm$ 2.86	53.18 $\pm$ 4.46 [*]	50.35

与给药前相比: ** $P < 0.01$; 与 Refludan 相比: ▲ $P > 0.05$; 与肝素相比: ## $P < 0.01$; △ 6 只家兔血浆全不凝; △△ 6 只家兔有 2 只家兔血浆不凝。

3.2 时效关系: 如表 2 图 1 所示。家兔 iv rH 50 $\mu\text{g/kg}$ 后 5, 15, 30, 60, 120 和 240 min TT 延长分别为 549.21%、72.08% ($P < 0.01$)、12.67%、14.06% ($P < 0.05$) 和 5.74%、6.24% ($P > 0.05$), 说明 TT 的延长随时间急剧下降, 60 min 后 TT 已接近给药前数值。APTT 延长分别为 126.74%、78.16%、45.66%、20.13% ($P < 0.01$) 和 5.70%、6.01% ($P > 0.05$)。APTT 最大延长不及 TT, 但呈缓慢平稳下降。与上述两种时间参数不同, 药后各时间点 PT 均无明显变化 ($P > 0.05$)。生理盐水组不同时间的 TT、PT、APTT 与注射生理盐水前相比均无显著变化 ($P > 0.05$), 说明如上心

脏采血对上述血凝时间参数无明显影响。

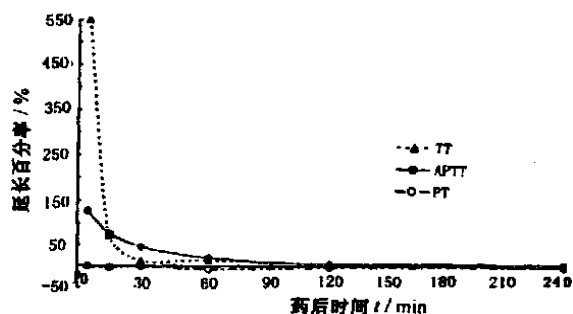


图 1 rH 对家兔 TT、PT 及 APTT 影响的时-效曲线

4 讨论

4.1 本研究表明国产 rH 具有明显的抗凝作用, 和

肝素一样能显著延长 TT和 APTT,但对 PT无延长作用,说明水蛭素在本实验剂量范围内作用于内

表 2 iv 50μg/kg rH后不同时间对家兔血凝时间参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组 别	采血时间 (min)	TT		PT		APTT	
		TT (s)	延长 (%)	PT (s)	延长 (%)	APTT (s)	延长 (%)
生理盐水	药 前	10.78± 0.47	—	9.8± 1.57	—	35.53± 2.46	—
	药后 5	11.68± 0.75	8.35	9.3± 1.20	— 5.10	36.52± 2.58	2.79
	药后 15	11.08± 0.64	2.78	9.28± 1.44	— 5.31	37.28± 3.41	4.93
	药后 30	11.33± 1.48	5.10	9.10± 1.14	— 7.14	36.08± 4.27	1.55
	药后 60	11.17± 1.58	3.62	8.48± 0.77	— 13.47	35.15± 5.17	— 1.07
	药后 120	11.25± 1.66	4.36	8.33± 0.69	— 15.00	37.77± 3.35	6.30
	药后 240	10.63± 1.06	— 1.39	9.13± 1.58	— 6.84	34.80± 3.23	— 2.05
	rH 药 前	10.10± 1.10	—	9.63± 0.68	—	34.93± 2.67	—
rH	药后 5	65.57± 43.33*△△	549.21	9.63± 1.09	0.00	79.20± 4.43*	126.74
	药后 15	17.38± 12.41*	72.08	9.30± 0.83	— 3.43	62.23± 6.49*	78.16
	药后 30	11.38± 1.41*	12.67	9.63± 0.56	0.00	50.88± 3.79*	45.66
	药后 60	11.52± 1.48*	14.06	9.00± 0.53	— 6.54	41.97± 2.43*	20.15
	药后 120	10.68± 0.79	5.74	9.33± 1.10	— 3.12	36.92± 3.00	5.70
	药后 240	10.73± 1.35	6.24	9.55± 1.49	— 0.83	37.03± 1.92	6.01

与给药前相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; △△ 6只家兔有 2只家兔血浆不凝

源性凝血通路,而对外源性凝血通路无作用。这与国外报道^[7]一致。

4.2 rH对 TT和 APTT的延长作用明显强于同剂量 (50μg/kg)的阳性对照药肝素,以 TT计强10倍以上;以 APTT计强约 2倍以上。

4.3 rH对 TT的延长持续时间甚短。TT延长随时间推移急剧下降,至 60 min时已接近药前水平,且量效关系的线性范围较窄,个体差异亦较大。当 rH剂量由 12.5增至 25μg/kg时,TT值由 12.75增至 14.32 s,但当剂量由 25增至 50μg/kg时,6只家兔中有 2只的血样不凝,导致 TT值标准差与均值接近;至 100μg/kg剂量时,全部家兔血样均不凝,由量反应转为质反应。与 TT不同,APTT的延长较平稳,持续时间较长,且呈良好的剂量依赖性和较宽的线性范围,个体差异较小。故 rH的临床抗凝治疗应象肝素一样采用 APTT而不是 TT作为治疗药物监测的指标^[8]。

4.4 Refludan是德国 Hoechst公司的基因重组水蛭素产品 Lepirudin的商品名,是由 65个氨基酸组成的多肽,N末端为 Leu¹-Thr^{2[9]},已经上市并应用于临床,是国际公认的重组水蛭素权威产品。受试国产 rH的结构与 Refludan仅在 N末端第一位氨基酸有所不同(前者为 Ile后者为 Leu),但其对 TT和 APTT的延长作用与同剂量 Refludan一致 ($P > 0.05$),说明国产 rH与国外权威产品作用强度

相同。另外,两种重组水蛭素对 PT均无影响。这些似乎说明将水蛭素 N末端第一位氨基酸以 Ile替换 Leu不致影响水蛭素的抗凝活性。

参考文献:

[1] Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug [J]. Thromb Res, 1994, 74(1): 1-23.
[2] 汪 钟,郑植荃.现代血栓病学[M].北京:北京医科大学出版社,1997.
[3] Nowak G, Markwardt F. Hirudin in disseminated intravascular coagulation [J]. Haemostasis, 1991, 21 (supple 1): 142-148.
[4] Bucha E, Nowak G, Markwardt F. Prevention of experimental coronary thrombosis by hirudin [J]. Folia Haematol, 1988, 115 (1/2): 52-58.
[5] Kaiser B, Simon A, Markwardt F. Antithrombotic effects of recombinant hirudin in experimental angioplasty and intravascular thrombolysis [J]. Thromb Haemost, 1990, 63(1): 44-47.
[6] Sirdge M S, Shannon R. Laboratory evaluation of hemostasis & thrombosis. 3rd ed [M]. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983.
[7] Margareta Elg, David Gustafsson, Stefan Carlsson. Antithrombotic effects and bleeding time of thrombin inhibitors and warfarin in the rat [J]. Thromb Res, 1999, 94 187-197.
[8] Nowak G, Bucha E. Quantitative determination of hirudin in blood and body fluids Simin [J]. Semin Thromb Hemost, 1996, 22(2): 197-202.
[9] Meiring S M, Lotter M G, Badenhorst P N, et al. Sites of elimination and pharmacokinetics of recombinant [¹³¹I] Lepirudin in baboons [J]. J Pharm Sci, 1999, 88(5): 523-529.