

水蛭素的生理处置及药动学研究现状

韩国柱

(大连医科大学 药理教研室, 辽宁 大连 116027)

摘 要: 水蛭素为活血化瘀中药水蛭的重要成分, 现已通过基因重组技术大量制备, 具有强大的抗凝抗栓作用。现对水蛭素的生理处置、临床前药动学和临床药动学及其血药浓度测定的研究进展进行综述, 为水蛭素的进一步研究和临床应用提供科学依据。

关键词: 水蛭素; 药动学; 生理处置; 测定方法

中图分类号: R285. 61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)08-附 6-03

Current status of studies on physiological disposition and pharmacokinetics of hirudin

HAN Guo-zhu

(Department of Pharmacology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Key words hirudin; pharmacokinetics; physiological disposition; assay method

水蛭素(hirudin)是活血化瘀中药水蛭中含有的一种重要有效成分, 系由 65 个氨基酸残基组成的单链多肽。现已通过基因工程技术成功地获得重组水蛭素(r-Hirudin, rH), rH 的氨基酸序列和构型与天然水蛭素相似, 仅在 63 位的酪氨酸缺少硫酸基, 药理和临床表明重组和天然水蛭素在药理活性和药动学(PK)方面十分相近, 统称水蛭素^[1]。水蛭素是迄今最强的特异性凝血酶抑制剂, 具有很强的抗凝和抗栓作用, 对血栓性疾病显示出卓越的临床疗效, 其治疗价值优于传统抗凝药肝素, 从而在国内外引起极大重视^[2]。近年, 国内外对水蛭素 PK 进行了广泛研究, 由于天然水蛭素来源有限, 文献报道的有关水蛭素 PK 多数得自 rH 的研究结果。

1 水蛭素的生理处置

1.1 吸收与分布: 本品口服吸收差, 但 sc 吸收良好(>75%), 注射后 1~2 h 血药浓度达峰值; 气管内灌注仅少许吸收^[3]。国内学者研究发现, 大鼠十二指肠给予 rH 50~200 mg/kg 后 1.5 h 即有明显抗凝作用, 在小鼠 30 min 后即有明显抗栓作用, 且具剂量依赖关系, 提示 rH 在肠道有一定吸收, 并认为这与水蛭素不易被胰蛋白酶水解, 对糜蛋白酶也有一定耐受性, 其分子中存在一个由 3 个二硫键组成的不易被降解的仍有抗凝活性的 N 端核心结构有关^[4]。但所用剂量大大超过静脉剂量, 亦说明肠道给药生物利用度低。

水蛭素为水溶性, 脂溶性差, 主要分布于细胞外液, 不易透过血脑屏障, 不与血浆蛋白结合^[5]。大鼠 iv rH 后用 ELISA 法测得各脏器药物含量远低于血液, iv 给药于 15 min rH 含量顺序为血浆>肺>心脏>脂肪>骨骼肌>肾>肝>脾>脑。

1.2 消除: 水蛭素主要经肾排泄, 在人体尿中排出剂量的

75%, 在犬几乎完全经肾小球滤过而清除, 在其他不同种属动物经肾排出量为: 40% (狒狒), 20% (猪) 和 10% (大鼠)^[3]。该药经肾排泄迅速, 犬单次 iv 天然水蛭素 0.5 mg/kg 后 1 h, 50% 以上的给药剂量从尿中排出^[5]。研究表明对于人、犬和兔, 水蛭素在血中稳定, 且较少被组织器官代谢^[3, 5], 尿中排出的药物主要是其非代谢形式, 但大鼠却显示完全不同的特点。近年日本学者 Komatsu 等的研究表明, 大鼠 iv rH 后尿中测不出非代谢型 rH, 尿中排出至少 6 种 C 末端被截除的肽类代谢物, 分别为 rH(1-49), rH(1-50), rH(1-51), rH(1-52), rH(1-54) 及 rH(1-55), 其比例约为: 1%, 51%, 3%, 11%, 19% 和 3%^[6]。有报道, 狒狒 iv ¹²⁵I-rH 后胆汁中回收的 ¹²⁵I-rH 达给药剂量的 51%, 说明肝脏对 rH 的消除起到了一定作用, 免疫组化研究显示 rH 存在于狒狒肝细胞以及胆管周围组织^[7]。

2 水蛭素临床前 PK

水蛭素从血浆消除较快, 其消除半衰期在多数动物种属不到 1 h, rH 在犬体内的药理学行为与人相似。Nowak 和 Markwardt 等对 rH 和天然水蛭素在犬体内的 PK 进行了较全面的研究^[3, 8], 血中水蛭素采用凝血酶时间法和生色底物法进行测定, 结果表明单次静脉推注 rH 0.5 mg/kg 后 2 min, 血浆浓度 7 μg/mL, 其后血药水平迅速下降, 60 min 后降至初始水平的 10% 以下, 其药理学行为可用二室模型描述; 该药半衰期短, 消除快速($t_{1/2\alpha}$ 0.25 h, $t_{1/2\beta}$ 1.22 h); 其分布容积约为体重的 1/3, 说明仅分布至细胞外液, 肾清除率接近总体清除率, 说明 rH 在犬的清除机制主要是肾清除。犬尿回收试验表明 90%~95% 的给药剂量以活性 rH 形式从尿排出, 仅少量 rH 可能被降解或在体内储存^[8]。尿排泄

* 收稿日期: 2002-04-02

作者简介: 韩国柱(1943-), 男, 江苏省泰州市人, 现为大连医科大学药理学教授, 主要从事药动学和抗血栓药理学研究。

速率对取样时间中点作图,其曲线形状与血药浓度时间曲线一致,说明肾清除是血药浓度的线性函数^[8]。肾切除犬 iv 同样剂量 rH 后,血药水平较肾功能正常犬大为上升,1 h 后约 75%~85% 的给药剂量被分布至血管外室,2 h 后血药水平几乎恒定且处于较高水平^[3,8]。犬 sc 同等剂量 (0.5 mg/kg) rH 后 90 min 血药浓度达峰值 (0.3 μ g/mL),8 h 后血药水平为 0.15 μ g/mL,其药动学行为可用血管外给药一室模型予以描述,其表现消除半衰期为 5.75 h,较静注时长。sc 的 AUC_{0-6h} 为 1.71 h $\cdot$ μ g/mL,而 iv 时的 AUC_{0-6h} 为 1.54 h $\cdot$ μ g/mL,说明 rH sc 生物利用度高。

天然水蛭素以上述两种途径给予相同剂量后血中药物浓度与 rH 几乎相同,其差别仅在于 rH 的肾清除率较天然水蛭素高 20%~25%,推测可能是 rH 分子中第 63 位赖氨酸残基脱硫酸基所致^[3,8]。

Richter 等应用 125 I 同位素标记示踪法进行了研究^[9],借助于凝血酶结合检测法测定液体中未改变的 125 I-rH 给大鼠和犬分别 iv 125 I-rH 1 和 0.5 mg/kg 后, 125 I-rH 的动力学行为亦遵循一级动力学二室模型,其消除半衰期较短,为 65 (大鼠)和 56.6 min (犬),稳态表观分布容积 V_{ds} 为 0.222 (大鼠)和 4.55 L (犬),清除率为 0.17 (大鼠)和 7.06 (犬) L/h。sc 125 I-rH 后消除半衰期较 iv 长得多,分别为 2 h (大鼠)和 5 h (犬)。Mering 等应用 131 I 同位素标记示踪法和蝥蛇毒凝结时间法测得 rH 在狒狒体内的 $t_{1/2}$ 分别为 24 和 23 min,两种方法均说明其消除甚快^[7]。

应用双抗体夹心 ELISA 法测得国产 rH 在大鼠体内消除半衰期亦较短 (45~50 min),并表明当剂量为 0.5~2.0 mg/kg 时 $t_{1/2}$ 不随剂量而改变, AUC 随剂量增加而成比例增加,说明此剂量范围内 rH 表现为线性动力学^[10];国内新近研制的新型重组水蛭素变异体 -2(rHV-2)给猴 iv 1,3,6 mg/kg 后测得 $t_{1/2}$ 1.53~1.85 h, MRT 0.30~0.32 h, V_{ds} 0.19~0.25 L/kg, CL 0.54~0.7 L/(h $\cdot$ kg), AUC 随剂量线性增加, $t_{1/2}$ 等参数不随剂量而改变。连续 7 d iv 相同剂量未见蓄积现象^[11]。

由于水蛭素半衰期短,近年长效水蛭素的研发备受重视。当以生物大分子或其他生物可降解高分子物质作为水蛭素载体,本品从血浆的清除可被延缓,例如葡聚糖或聚乙二醇结合水蛭素后,半衰期可分别延长至 7 h 和 5~9 h^[12,13]。

水蛭素的抗凝作用完全取决于其血浆水平,因为其不仅在血液转运,而且作用部位也仅在血循环系统^[1]。PK-PD 关系研究表明其血浆浓度与其抗凝作用的相关性在 iv 明显优于 sc^[14];另外,rH 血药浓度与凝血时间参数 APTT 延长的相关性优于与 TT 延长的相关性。APTT 显示了较宽的线性范围,上限高至 0.5 μ g/mL,而 TT 的线性仅为 0.05~0.15 μ g/mL^[5]。研究还表明血药浓度与抗凝作用的相关关系明显优于血药浓度与抗栓作用的相关关系,有报道在几种动物模型中 rH 的抗栓持续时间长于按血浆半衰期计算应持续的时间,当 rH 的血浆浓度已减少至检测限或已从血浆清除后,其抗栓作用仍很明显^[15]。

3 水蛭素临床 PK

临床期的 PK 资料表明^[3],健康人 iv 水蛭素后的动力学遵循开放二室模型一级动物力学, $t_{1/2\alpha}$ 和 $t_{1/2\beta}$ 分别为 10~15 min 和 60~100 min,说明 rH 消除较快,本品表现分布容积较小,约 0.28 L/kg,相当于细胞外液体积,总体清除率和肾清除率分别为 170 和 130 mL/min,肾清除率为总体清除率的 80%,说明肾清除是其从人体内清除的主要途径。连续 sc 可使水蛭素血药浓度相对稳定在一段较长时间内。治疗中每 8 h 用药一次,未引起蓄积。水蛭素的肾清除率与肌酐清除率具有明显的线性相关,肾功能不全病人,水蛭素清除相对延长。双侧肾切除病人,本品的半衰期延长至 10 d。肾病患者因其肾清除延长,其 AUC 值可较健康自愿者高约 30 倍。对于临床中进行血液透析的病人,水蛭素的肾清除率具有特殊重要性,其血循环中的消除速率取决于透析膜孔径的大小。例如,采用极限点为 15 kD 的血液透析膜时,水蛭素的半衰期为 6~8 h^[3]。Bichler 用一种特殊 RIA 测定法研究了天然水蛭素在健康人体的 PK,iv 属典型的二室模型,sc 属血管外给药一室模型。测得 $t_{1/2}$ 65 min, V_d 17.2 L,尿累积排泄量为剂量的 50%,sc 给药的生物利用度为 85%^[16]。

一项有 47 名健康人参加的多中心研究表明^[17],在静脉推注 rH 0.1,0.3,0.5 和 1.0 mg/kg 后用 ELISA 法测得平均峰浓度分别为 154,443,764 和 1691 nmol/L;其 PK 参数为: CL 2.20 mL/(min $\cdot$ kg), MRT 2.12 h, V_{ds} 0.27 L/kg 说明血药浓度与剂量成比例,PK 参数为剂量非依赖性,静脉滴注不同剂量所得 PK 参数与静脉推注结果一致,这些说明 rH 属线性动力学。血药浓度和药效关系的研究表明,在 rH 为 100 和 1000 nmol/L 血浆时,激活的部分凝血活酶时间 (APTT_t) 分别为基础值 APTT₀ 的 2 倍和 4 倍,遵循抛物线函数,其 APTT_t/APTT₀ 比值对 rH 血药浓度的平方根作图呈线性相关^[17]。

4 水蛭素在生物样品中的测定

通常的 HPLC 法不适用,因水蛭素分子中缺少生色基团,紫外检测灵敏度很低,加之水蛭素缺少脂溶性,难以通过有机溶媒萃取富集。

4.1 生物测定法

4.1.1 凝血酶时间测定法:水蛭素可引起凝血酶时间 (TT) 的延长,并与 rH 血药浓度具有相关性。0.2 mL 血样加入 0.05 mL 凝血酶溶液 (20 NIH-u/mL) 后测定血凝时间,根据 TT 延长并借助标准曲线计算本品浓度^[18,19]。

4.1.2 生色底物法:该法系利用生色底物测定系统中剩余凝血酶的酰胺水解活性,从而定量血浆中水蛭素。通常采用 chromozym TH (Tos-Gly-Pro-Arg-PNA) 为生色底物。凝血酶能使该生色底物的酰胺键水解从而释放出生色物质 4 硝基苯胺。后者可于 405 nm 处测定吸光度。水蛭素能抑制凝血酶的上述反应,并具有定量关系^[8,19,20]。

4.1.3 蝥蛇毒凝血时间测定法 (ECT):蝥蛇毒 (ecarin) 是自 *Echis Carinatus* 蛇毒中提取纯化的一种酶,能直接激活凝血酶原,导致中间体 meizothrombin 生成,后者与通常的凝血

酶原-凝血酶转化中间体不同,本身具备蛋白水解活性,可使纤维蛋白原生成纤维蛋白,水蛭素能与 meizothrombin 结合,并抑制其活性,从而引起 ECT 延长。样品中加入水蛭素和蝥蛇毒后,未与水蛭素结合的中间体可将纤维蛋白原转化为纤维蛋白,其 ECT 的延长与水蛭素具有极好相关性。且线性范围很宽 (20~ 4 000 ng /mL)。该法简单、快速、可靠,且不受肝素干扰,不仅适用于动物实验研究,尤其适于临床 TDM^[5, 21]。

4.2 免疫测定法

4.2.1 放射免疫测定法 (RIA): 该法系将恒定量的 ¹²⁵I-标记水蛭素与含有未知量水蛭素的试样混合,在加入凝血酶后,标记及未标记水蛭素彼此竞争与凝血酶结合,然后将结合型与未结合型水蛭素通过双抗体技术加以分离,第一抗体为抗凝血酶 IgG,它与水蛭素-凝血酶复合物结合,第二抗体为针对第一抗体的抗体,用于沉淀上述复合物。Bichler 将这种 RIA 称为放射免疫生物测定法 (radioimmunoassay, RIBA)。该法灵敏度高,最低检出限为 10 ng/mL。

4.2.2 酶联免疫吸附测定法 (ELISA): 该法已成为水蛭素 PK 研究的优选方法,现今已有多种专用于水蛭素测定的试剂盒,不同公司出品的试剂盒的抗体和生色系统有所不同。美国 ADI 公司生产的试剂盒其包被抗体为兔抗水蛭素多克隆抗体,酶标抗体为 HRP-鼠抗水蛭素单克隆抗体,四甲联苯胺 (TMB) 为酶底物。本法特异性高,最低检出限为 0.1 ng/mL。国内学者应用该法研究了国产 rH 在大鼠和猴体内的 PK,获得了满意结果^[10, 11]。

4.3 同位素标记示踪法: Richter 等研究了 ¹²⁵I-水蛭素在大鼠和狗体内的 PK^[9],结果表明采用测定总放射活性的方法缺乏特异性,不能代表水蛭素在血样中的浓度。必须联合其他分离手段如凝血酶结合测定法方可提高其特异性。

5 结语

水蛭素为直接作用的凝血酶抑制剂,其抗凝作用不依赖于辅因子 AT-III,较间接作用抗凝药肝素为优,但缺点是半衰期短,且必须注射给药。目前,国外长效水蛭素已进入临床试验阶段,国内已有几家从事 rH 的研发。积极开展水蛭素 PK 研究,特别是水蛭素临床 PK 研究以及 PK-PD 关系和 TDM 的研究对其临床合理使用及新剂型研发具有重要意义。

References

- [1] Han G Z. *Pharmacokinetics of Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药药代动力学) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1999.
- [2] Han G Z. Progress in studies of antithrombotic drugs [J]. *Her Med* (医药导报), 2000, 19 (Suppl): 1-4.
- [3] Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug [J]. *Thromb Res*, 1994, 74(1): 1-23.
- [4] Han Y M, Lu Y F, Wang Z H, *et al.* Experimental studies on anticoagulant and antithrombotic effects of r-hirudin after duodenal administration [J]. *Chin J Haematol* (中华血液学杂志), 1999, 20(9): 483-484.
- [5] Nowak G, Bucha E. Quantitative determination of hirudin in blood and body fluids [J]. *Semin Thromb Hemost*, 1996, 22 (2): 197-202.
- [6] Komatsu Y, Hayashi H. Characterization of C-terminal-truncated urinary metabolites of a recombinant hirudin in rats [J]. *Peptide*, 1999, 20(12): 1401-1409.
- [7] Meining 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.
- [8] Nowak G, Markwardt F, Fink E. Pharmacokinetic studies with recombinant hirudin in dogs [J]. *Folia Haematol (Leipzig)*, 1988, 115(1-2), s70-s74.
- [9] Richter M, Cyranka U, Nowak G, *et al.* Pharmacokinetics of ¹²⁵I-hirudin in rats and dogs [J]. *Folia Haematol (Leipzig)*, 1988, 115(1-2): s64-s69.
- [10] Jiang S Y, Li G S, Han G Z. Studies on the pharmacokinetics of hirudin by ELISA [J]. *Chin J Pharm Sci* (中国药学杂志), 2002, 37(7): 556-557.
- [11] Liu X W, Song H F, Tang Z M, *et al.* Pharmacokinetics and partial thromboplastin time after intravenous recombinant hirudin variant-2 in rhesus monkeys [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2002, 23(9): 842-846.
- [12] Markwardt F, Richter M, Walsmann P, *et al.* Preparation of dextran-bound recombinant hirudin and its pharmacokinetic behaviour [J]. *Biomed Biochem Acta*, 1990, 49(10): 1103-1108.
- [13] Zawilska K, Zozulinska M, Turowiecka I, *et al.* The effect of a long-acting recombinant hirudin (PEG-hirudin) on experimental disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits [J]. *Thromb Res*, 1993, 69(3): 315-320.
- [14] Lye L, Koza M, Labai O, *et al.* Studies on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of hirudin (rH2-lys47) after intravenous and subcutaneous administration in dogs [J]. *Thromb Res*, 1993, 69(3): 256-269.
- [15] Agnelli G, Renga C, Weitz J I, *et al.* Sustained antithrombotic activity of hirudin after its plasma clearance comparison with heparin [J]. *Blood*, 1992, 80(4), 960-965.
- [16] Bichler J, Siebeck M, Fichtl B, *et al.* Pharmacokinetics, effect on clotting test and assessment of the immunogenic potential of hirudin after a single subcutaneous or intravenous bolus administration in man [J]. *Haemostasis*, 1991, 21 (Suppl): 137-141.
- [17] Marbet G A, Verstraete M, Kienast J, *et al.* Clinical pharmacology of intravenously administered recombinant desulfato-hirudin (CGP39393) in healthy volunteers [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, 22: 264-372.
- [18] Markwardt F, Kaiser B, Nowak G. Studies on antithrombotic effects of recombinant hirudin [J]. *Thromb Res*, 1989, 54: 377-388.
- [19] Griebach U, Sturzebecher C, Markwardt F. Assay of hirudin in plasma using a chromogenic thrombin substrate [J]. *Thromb Res*, 1985, 37: 347-350.
- [20] Groesch H, Damm D, Youssdl R B, *et al.* Comparison of two different methods for the determination of rDNA-hirudin in plasma samples: HPLC vs a chromogenic thrombin substrate [J]. *Thromb Res*, 1991, 64: 273-277.
- [21] Nomak G. Clinical monitoring of hirudin and direct thrombin inhibitors [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2001, 27(5): 537-541.