

## • 基础研究 •

## 国产水蛭肽对兔抗凝疗效观察

李珊, 盖鲁粤

[摘要] 目的 研究国产水蛭肽在兔体内的抗凝活性, 为水蛭肽临床应用提供实验依据。方法 兔静脉注射水蛭肽前及后心脏采血, 应用血凝仪测定凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、活化的部分凝血活酶时间(APTT), 并观察其量效和时效关系及与肝素的抗凝疗效比较。结果 水蛭肽能明显延长 TT、PT、APTT, 且呈剂量依赖性, 其抗凝作用随时间延长而下降, 作用持续时间约 60 min, 水蛭肽抗凝疗效至少与肝素相同。结论 水蛭肽具有明显抗凝作用, 量效关系明确, 不亚于现有抗凝药肝素。

[关键词] 水蛭肽; 抗凝; 兔

Anticoagulant Activity of Hirulog in Rabbits in Vivo LI Shan, GAI Lu-yue. General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

**Abstract:** **Objective** To study the anticoagulant activity of hirulog. **Methods** Rabbits blood samples were collected before and after injecting hirulog. Thrombin clot time (TT), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) were measured to investigate the dose-effect and time-effect relationship of hirulog and compared the efficacy with heparin. **Results** TT, PT and APTT of rabbits blood samples were prolonged remarkably by hirulog, and the action duration was about 60 min, that was similar to heparin. **Conclusion** Hirulog showed obvious anticoagulant effects with clear dose-effect relationship.

**Key words:** hirulog; anticoagulant; rabbits

[中图分类号] R543 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)05-0421-02

[本文著录格式] 李珊, 盖鲁粤. 国产水蛭肽对兔抗凝疗效观察[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(5): 421-422.

水蛭素(hirudin)是活血化淤中药水蛭的唾液腺分泌的一种 65 氨基酸酸性多肽, 为高度特异的直接凝血酶抑制剂, 具有强大的抗凝和抗栓作用, 对多种血栓性疾病有很好的预防和治疗效果。但水蛭药材来源有限, 使水蛭素的研究与临床应用受限。化学合成的水蛭素片断水蛭肽(hirulog, 商品名 bivalirudin, 百维立肽), 为含 20 个氨基酸的多肽片断, 分子量 2180 Da, 保留了水蛭素的有效活性片断, 在保存抗凝抗栓疗效的同时, 可以降低成本, 大批量生产。本文研究水蛭肽对兔凝血参数的影响, 以了解其体内抗凝活性, 为国产水蛭肽新药开发提供实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料 水蛭肽: 中国人民解放军总医院; 注射用肝素钠(heparin): 上海生物化学制品厂。凝血酶试剂: 天津血液研究所; 凝血活酶试剂: 美国 Behring 公司; 活化的部分凝血活酶试剂: 美国 IL 公司; 枸橼酸钠, 浙江杭州萧山化学试剂厂。新西兰兔, 雌雄不拘, 体重 1.5 ~ 2.5 kg, 中国人民解放军总医院动物试验中心。CA-100 型血凝分析仪, 日本 SYS MAX 医用电子仪器有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 量效关系 新西兰兔 24 只, 随机分 4 组: 水蛭

肽 1 mg/kg、2 mg/kg、4 mg/kg 组、阳性对照药肝素 150 U/kg 组, 每组 6 只。新西兰兔经耳缘静脉静推药物, 给药前及给药后 5 min 自心脏取血 2.7 ml, 以 3.2% 枸橼酸钠抗凝(9:1)混匀后, 3000 r/min 离心 3 min, 取血浆, 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, 超过 120 s 或不凝按 120 s 计。

1.2.2 时效关系 新西兰兔 6 只, 经耳缘静脉注射药物前和给药后 5 min、30 min、60 min、120 min 分别自心脏采血, 测定 APTT、PT、TT。

1.3 统计学方法 应用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析。实验结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

2.1 量效关系 兔静脉注射 3 种剂量的水蛭肽后, APTT、PT、TT 较给药前均明显延长( $P < 0.01$ )。其中水蛭肽 2 mg/kg 组接近肝素组, 4 mg/kg 组优于肝素组( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 时效关系 兔静脉注射水蛭肽 2 mg/kg 后, APTT、PT、TT 随时间延长而下降, 给药后 60 min 已接近给药前数值。见表 2。

## 3 讨论

水蛭肽与肝素相比有以下区别: ①水蛭肽特异性抑制凝血酶, 肝素为间接凝血酶抑制剂, 同时抑制凝血

作者单位: 解放军总医院, 北京市 100853。作者简介: 李珊(1973-), 女, 安徽巢湖市人, 博士, 主治医师, 主要研究方向: 冠心病介入治疗。

酶及因子 Xa; ②水蛭肽不受血小板 4 因子 (platelet factor 4, PF4) 的影响, PF4 与肝素有高度亲和力, 可在局部使肝素灭活<sup>[1]</sup>; ③水蛭肽能有效灭活与纤维蛋白或纤维蛋白原降解产物 (FDP) 结合的凝血酶, 对与血凝块结合的凝血酶抑制作用同样强大, 而肝素对与血凝块结合的凝血酶几乎不起作用<sup>[2]</sup>; ④水蛭肽抗凝作用不依赖抗凝血酶 III 的存在, 使其抗凝作用的量效关系更明显, 而且可在缺乏抗凝血酶 III 的患者 (如严重休克患者) 中使用<sup>[3]</sup>, 肝素则依赖抗凝血酶 III 为辅助因子; ⑤肝素诱导血小板减少是一种严重并发症, 而水蛭肽无此效应<sup>[4]</sup>。

表 1 不同剂量水蛭肽免凝血时间比较 (s)

组别	时间	APTT	PT	TT
水蛭肽 1 mg/kg	给药前	44.70 ± 7.02	8.53 ± 0.78	20.68 ± 2.99
	给药后	67.03 ± 9.58 <sup>a</sup>	12.45 ± 2.07 <sup>a</sup>	41.47 ± 7.65 <sup>a</sup>
水蛭肽 2 mg/kg	给药前	41.98 ± 5.10	8.40 ± 1.18	22.18 ± 3.82
	给药后	94.27 ± 12.63 <sup>a</sup>	15.15 ± 3.33 <sup>a</sup>	70.0 ± 15.80 <sup>a</sup>
水蛭肽 4 mg/kg	给药前	43.82 ± 7.45	8.23 ± 0.60	22.3 ± 4.21
	给药后	132.25 ± 20.27 <sup>a,b</sup>	21.75 ± 6.22 <sup>a,b</sup>	103.23 ± 14.38 <sup>a,c</sup>
肝素	给药前	46.30 ± 7.30	7.88 ± 0.75	21.22 ± 2.78
	给药后	101.98 ± 17.82 <sup>a</sup>	14.45 ± 2.52 <sup>a</sup>	57.78 ± 14.63 <sup>a</sup>

注: a: 与给药前相比,  $P < 0.01$ ; 与肝素组相比, b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ 。

本研究中, 3 种剂量的水蛭肽均能明显延长 APTT、PT、TT, 并呈明显剂量依赖关系; APTT、PT、TT 随时间延长而下降, 作用约持续 60 min。研究也发现, 水蛭肽 2 mg/kg 与肝素 150 U/kg 在给药后 5 min 时作用相似, 更高剂量则优于肝素。

天然水蛭素的医用价值早已备受关注, 但因材料来源限制, 人们将注意力转向用基因工程手段重组水蛭素, 但重组水蛭素价格昂贵, 临床应用受到限制。最近认为, 化学合成制剂水蛭肽是一种高效、专一、安全

的凝血酶抑制剂, 与肝素相比, 水蛭肽用量小、疗效高、不良反应少, 不会引起过敏反应。水蛭肽有望成为新型的抗凝、抗栓药物<sup>[5]</sup>。

表 2 水蛭肽 2 mg/kg 不同时间免凝血时间比较 (s)

采血时间	APTT	PT	TT
给药前	41.98 ± 5.10	22.18 ± 3.82	
药后 5 min	94.27 ± 12.63 <sup>a</sup>	15.15 ± 3.33 <sup>a</sup>	70.0 ± 15.80 <sup>a</sup>
药后 30 min	65.38 ± 12.38 <sup>a</sup>	11.02 ± 1.74 <sup>b</sup>	36.65 ± 6.74 <sup>a</sup>
药后 60 min	51.55 ± 12.18	9.87 ± 1.81	25.93 ± 6.34
药后 120 min	43.12 ± 4.96	8.65 ± 1.46	24.38 ± 6.20

注: 与给药前相比, a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.05$ 。

## [参考文献]

- [1] Aremblock IJ. Effectiveness of hirulog in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits [J]. J Vasc Res, 1996, 33(4): 308 - 314.
- [2] Muller DW, Gordon D, Topol EJ, et al. Sustained-release local hirulog therapy decrease early thrombosis but not neointimal thickening after arterial stenting [J]. Am Heart J, 1996, 131(2): 211 - 218.
- [3] Fuchs J, Cannon CP. Hirulog in the treatment of unstable angina. Results of the Thrombin Inhibition in Myocardial Ischemia (TIMI 7) trial [J]. Circulation, 1995, 92(4): 727 - 733.
- [4] Bittl JA. Comparative safety profiles of hirulog and heparin in patients undergoing coronary angioplasty. The Hirulog Angioplasty Study Investigators (THASI trial) [J]. Am Heart J, 1995, 130(3): 658 - 665.
- [5] Michael AJ. Bivalirudin provisional glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with heparin and planned glycoprotein IIb/IIIa blockade during percutaneous coronary intervention. REPLACE-2 Randomized Trial [J]. JAMA, 2004, 292(6): 696 - 703.

(收稿日期: 2007-02-06)