

低分子量肝素对血凝及动、静脉血栓形成的影响

李晓祥 赵挺¹ 李耐三

(中国药科大学药理学教研室, 南京 210009)

摘要 以标准肝素(SH)为原料经亚硝酸裂解制备的低分子量肝素(LMWH), 给予同等抗X_a单位剂量时, 对凝血系统的影响较SH小, 在治疗量下(100 anti-X_a IU/kg)不增加出血倾向; 体外实验表明, LMWH能有效地抑制Chandler模型的血栓形成; 体内实验表明, LMWH在100~200 anti-X_a IU/kg范围内能有效地抑制大鼠动-静脉旁路、大鼠颈动脉电流损伤(iv, sc)和家兔颈静脉血栓模型的血栓形成, 与参照品Fragmin及SH的作用相似, LMWH在上述模型中的ED₅₀分别为: 159, 185 (iv), 193 (sc), 91 anti-X_a IU/kg; 研究还发现, sc LMWH吸收完全, 给药后3 h的抗血栓作用与iv后10 min相似, 而SH的作用弱。提示LMWH保留了SH的抗血栓作用, 降低了SH的出血副作用。

关键词 标准肝素; 低分子量肝素; 抗血栓

低分子量肝素(LMWH)是八十年代初从标准肝素(SH)中分离得到的分子量较小的肝素片段, 它具有SH的基本结构, 可以与抗凝血酶Ⅲ(AT Ⅲ)结合, 加强AT Ⅲ对X_a因子(FX_a)的灭活, 但对凝血酶的影响较小^[1,2], 是低出血副作用的肝素类似物。研究表明, LMWH具有抗凝、抗血栓、抗炎、抗病毒、防血脂等多方面作用。血栓是临床上常见的疾病, 动、静脉的损伤、血流及血液成分的改变、创伤以及感染都可引起有关凝血因子(VI、XI、X)释放并激活, 从而引起血栓形成。多年来, 肝素是临床上常用的抗血栓药物, 但由于肝素的严重出血副作用, 临床应用受到限制^[3], 低抗凝、高抗栓活性的肝素类似物的研究成为人们的共同兴趣。LMWH的研究能为临床的血栓防治提供资料。本文着重研究LMWH对凝血系统及动、静脉血栓形成的影响, 并与SH进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料

动物 Sprague-Dawley系大鼠, 体重180

~250 g, 雌雄兼用; 家兔体重1.5~2.5 kg, 雌雄兼用, 由中国药科大学动物室提供。

试剂 SH, 抗凝效价140 u/mg(南京生化厂); X_a因子(SIGMA公司); Fragmin(瑞典Kabi公司); 尿激酶(南京大学制药厂); 人血清(中心血站); 其它试剂均为分析纯。

LMWH以SH为原料, 采用亚硝酸裂解法制备得^[4], 理化性质测定和光谱鉴定结果表明LMWH与参照品结构相同, 粘均分子量为5400 d, APTT效价为34 u/mg, 以X_a因子凝集法测定^[5], LMWH的抗X_a因子效价为158 anti-X_a IU/mg。使用时以生理盐水稀释至一定浓度。

1.2 实验方法

1.2.1 对凝血、纤溶系统的影响^[6~8]

取家兔36只, 雌雄各半, 1.5~2.0 kg, 随机分成六组, 分别手术分离一侧颈动脉, 并作颈动脉插管。各组分别耳缘iv, 给药剂量分别为: LMWH 50, 100, 200 anti-X_a IU/kg, Fragmin 100 anti-X_a IU/kg, SH 100 anti-X_a IU/kg, 空白组5.0 ml/kg生理盐水(各药均以生理盐水配制, 给药容积为: 5.0 ml/kg)。30

收稿日期 1995-10-10 ¹1993届本科毕业生

min 后,颈动脉取血测定全血凝时间(CT),另取血 5 ml,以 3.8%枸橼酸钠抗凝(1:9),3000 r/min 离心 10 min,分离血浆,测定复钙时间(RT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、白陶土部分凝血活酶时间(KPTT)、纤维蛋白原含量(Fg)、优球蛋白溶解时间(ELT)、纤维蛋白溶解活力(FA)。

1.2.2 体外抗血栓作用^[9]

取雄性家兔,体重 2.0~2.5 kg,以戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘 iv 麻醉,手术分离一侧颈总动脉并作动脉插管。取已硅化的塑料管旋转环(直径 4 mm),向每管加试剂或生理盐水 0.2 ml,动脉血 0.8 ml,于体外血栓测定仪中,37℃ 下转动 10 min,转速为 16 r/min,10 min 后停止转动,取出血栓,并以滤纸吸干血液,自然拉直,测量血栓长度,称取湿重,40℃ 恒重 24 h,称取干重,比较各用药组抗血栓情况。

给药剂量分别为:LMWH 1,0.5,0.25 anti-X_a IU/ml, Fragmin 0.5 anti-X_a IU/ml, SH 0.5 anti-X_a IU/ml,空白组为 0.2 ml 等体积生理盐水。

1.2.3 体内抗血栓作用

对大鼠动-静脉旁路血栓形成的影响^[10]

取大鼠 60 只,220~250 g,雌雄各半,随机分成六组,ip 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉,手术分离右侧颈总动脉,左侧颈外静脉,以硅化的塑料管作动-静脉搭桥(动-静脉搭桥由 4 部分组成:①动脉端 5 cm,直径 1.5 mm;②静脉端 10 cm,直径 1.5 mm;③接头乳胶管 0.5 cm,直径 1.5 mm;④4 号手术丝线长 6 cm),管内充满生理盐水,动脉端插入右侧颈总动脉,另一端插入左侧颈外静脉。股静脉给药,剂量分别为:LMWH 50,100,200 anti-X_a IU/kg, Fragmin 100 anti-X_a IU/kg, SH 100 anti-X_a IU/kg,空白组 5.0 ml/kg 生理盐水,10~15 s 内注射完毕,开放血流 15 min,然后取出丝线,吸干血液,称重,比较各用药组抗血栓情况,并计算血栓抑制率(%)。

血栓抑制率(%)=

$$\frac{\text{空白对照组血栓湿重}-\text{给药组血栓湿重}}{\text{空白对照组血栓湿重}} \times 100\%$$

对大鼠颈动脉电流损伤血栓模型的影响^[11]

取大鼠 60 只,180~220 g,雌雄各半,随机分成六组,ip 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉,手术分离一侧颈总动脉约 1.5 cm,将实验性体内血栓形成测定仪的刺激电极和温度探头钩于动脉血管上,股静脉给药,剂量分别为:LMWH 50,100,200 anti-X_a IU/kg, Fragmin 100 anti-X_a IU/kg, SH 100 anti-X_a IU/kg,空白组 5.0 ml/kg 生理盐水,10~15 s 内注射完毕,10 min 后,用 1.5 mA 的直流电持续刺激 7.0 min。当动脉内形成混合血栓堵塞血流时,动脉血管远心端温度突然下降。从刺激开始到温度突然下降所需时间称为堵塞时间(occlusion time,OT)。比较各组堵塞时间,并计算血栓抑制率(%)。

血栓抑制率(%)=

$$\frac{\text{给药组堵塞时间}-\text{空白对照组堵塞时间}}{\text{空白对照组堵塞时间}} \times 100\%$$

另取 36 只大鼠,雌雄各半,随机分成六组,sc,剂量同上,3 h 后观察作用,并同静脉给药进行比较。

对家兔颈外静脉血栓的影响^[12]

取健康家兔 36 只,雌雄各半,体重 2.0~2.5 kg,随机分成六组。以 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 左侧耳缘 iv 麻醉,手术分离右侧颈总静脉 1~2 cm,结扎侧支,各组分别左侧耳缘 iv,10 min 后,由右侧耳缘 iv 预热的人血清(1.32 ml/kg,并用生理盐水稀释到 5 ml,37℃ 预热 15 min),15 s 内注射完毕,其后 10~15 s 内,用动脉夹轻轻夹住颈外静脉两端,阻断血流 10 min,然后剪下这段静脉血管,检查血栓并打分,打分标准见图 1。剂量分别为:LMWH 50,100,200 anti-X_a IU/kg, Fragmin 100 anti-X_a IU/kg, SH 100 anti-X_a IU/kg,空白组 5.0 ml/kg 生理盐水。

1.2.4 检验方法 采用组间 t 检验。

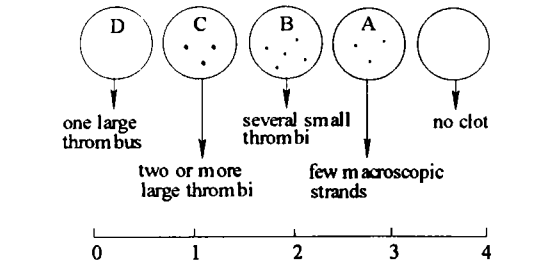


Fig 1. Evaluation of the antithrombotic effect of LMWH in rabbit thrombus model
A; score of one; B; score of two; C; score of three; D; score of four

2 结 果

2.1 对凝血系统的影响

LMWH 低剂量 (50, 100 anti- X_a IU/kg)

Tab 1. Effect of LMWH iv on coagulation system in rabbits($\bar{x}\pm s$, n=6)

Drugs, anti- X _a IU/kg	CT, min	RT, min	PT, s	TT, s	KPTT, s
LMWH 50	18.5±0.5	4.9±0.7***	11.8±1.2	19.6±4.3	41.2±2.3
100	19.5±0.4***	7.6±1.3***	13.0±0.6***	39.0±13.1***	42.2±7.6***
200	26.3±4.5**	12.0±2.9***	14.2±1.1***	77.0±22.0***	48.6±7.0
Fragmin 100	19.9±1.7***	8.5±1.3***	13.3±0.9***	61.5±15.4***	45.7±3.4
SH 100	28.5±7.0***	11.2±2.9***	17.4±2.4***	132.0±32.9***	54.0±3.6***
Saline	19.0±1.9	3.6±0.4	11.5±1.0	17.2±2.2	43.1±1.4

*** P<0.01, vs saline, **P<0.05, ***P<0.01, vs SH

2.2 对纤溶系统的影响

中剂量 (100 anti- X_a IU/kg) LMWH, Fragmin 和 SH 均可降低纤维蛋白原含量 ($P<0.01$), 低剂量 LMWH 作用弱 ($P>0.05$), 高剂量 LMWH 组纤维蛋白原含量降低, 平均幅度与中剂量相近, 但个体差异较大 ($P=0.05$)。各组对 ELT 和纤溶活力的影响小, 没有发现 LMWH 促进纤溶的作用 (见表 2)。

2.3 体外抗血栓作用

LMWH 各剂量组和 Fragmin 及 SH 各组均表现出较强的抗血栓作用 ($P<0.01$)。LMWH 呈现剂量依从性, 同等剂量的 LMWH 和 Fragmin 作用相似 ($P<0.05$), 但两者都比 SH 作用弱 ($P<0.05$) (见表 3)。

对全血凝固时间无影响, 与同等剂量 Fragmin 相似, LMWH 高剂量 (200 anti- X_a IU/kg) 与 SH 均能延长全血凝固时间 ($P<0.01$); LMWH 各剂量组对复钙时间均有极显著的影响 ($P<0.01$), 同等剂量情况下 SH 对复钙时间的延长作用更强 ($P<0.05$); LMWH 低剂量组 (50 anti- X_a IU/kg) 对凝血酶原时间、凝血酶时间均无明显影响, 但中、高剂量组 (100, 200 anti- X_a IU/kg) 对两者都有延长作用, 同等剂量与 Fragmin 作用相似, 而 SH 作用强; LMWH 对 KPTT 指标无显著影响, SH 能明显延长 KPTT (见表 1)。从以上结果可看出, 同等剂量 (anti- X_a IU/kg) 情况下, LMWH 对凝血系统的影响较 SH 小。

Tab 2. Effect of LMWH iv on fibrinolytic system in rabbits ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Drugs, anti- X _a IU/kg	Fg, mg%	ELT, h	FA*, A
LMWH 50	287.2±41.2	2.8±0.9	0.75±0.14
100	278.2±22.0***	2.5±1.1	0.76±0.12
200	276.0±52.2**	2.7±1.3	0.73±0.10
Fragmin 100	256.3±43.4***	2.7±1.4	0.78±0.06
SH 100	228.9±25.0***	2.9±1.1	0.80±0.09
Saline	328.9±31.5	3.5±1.5	0.80±0.08

*** P<0.01, vs saline, **P<0.01, vs SH, *FA: Fibrinolytic activities

2.4 对大鼠动-静脉旁路血栓的影响

LMWH 各剂量组和 Fragmin 及 SH 均能有效地抑制此模型的血栓形成 ($P<0.01$)。LMWH 呈现剂量依从性 ($P<0.01$), 同等剂量相比较, 三者作用无显著性差异 ($P>0.05$)。以血栓百分抑制率计算 LMWH ED₅₀ 为 159 anti- X_a IU/kg (见表 4)。

Tab 3. Effect of LMWH in thrombosis *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Drugs,		Thrombus length, mm	Thrombus weight, mg	
anti- X _a IU/ml			Wet	Dry
LMWH	0.25	10.9±4.6***	58.52±22.24***	12.21±4.85***
	0.5	4.6±0.8***	23.04±4.93***	5.38±1.24***
	1.0	4.2±0.6***	17.51±5.44***	4.19±1.54***
Fragmin	0.5	4.6±0.9***	27.53±6.34***	6.28±1.26***
SH	0.5	3.6±0.8***	14.77±8.33***	3.63±2.25***
Saline		36.8±7.3	163.98±24.05	38.41±5.80

*** $P<0.01$, vs saline; ** $P<0.05$, *** $P<0.01$, vs SH

Tab 4. Effect of LMWH iv on the thrombosis of arteriovenous shunt in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Drugs,	Thrombus weight,	Inhibition,	ED ₅₀ ,
anti- X _a IU/kg	mg/cm	%	anti- X _a IU/kg
LMWH	50 3.55±0.47***	21.34±10.38	159
	100 2.76±0.50***	38.87±11.10	
	200 1.86±0.53***	58.92±11.82	
Fragmin	100 2.94±0.52***	34.98±11.58	
SH	100 2.65±0.39***	41.41±8.56	
Saline	4.52±0.48		

*** $P<0.01$, vs saline

2.5 对大鼠颈动脉电流损伤性血栓的影响
股静脉给药各剂量组与空白组相比,堵

塞时间有显著差异($P<0.05$),同等剂量情
况下,LMWH、Fragmin 及 SH 均能有效抑制
血栓形成,并且三者作用无差异($P>0.05$),
LMWH 各剂量组表现出剂量依从性。以血栓
百分抑制率计算,LMWH ED₅₀为 185 anti- X_a
IU/kg。于测定堵塞时间的同时,以毛细管法
测血凝时间。结果表明:与空白组比较,
LMWH 及 Fragmin 各组凝血时间无显著性差
异($P>0.05$),而 SH 有极显著差异($P<$
0.01)(见表 5)。

Tab 5. Effect of LMWH iv on carotid thrombosis in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Drugs,	CT,	OT,	Inhibition,	ED ₅₀ ,
anti- X _a IU/kg	min	min	%	anti- X _a IU/kg
LMWH	50 1.2±0.4	18.3±1.4**	11.84±8.48	185
	100 1.2±0.2	20.4±1.1***	24.87±6.41	
	200 1.3±0.3	25.2±2.3***	54.43±14.22	
Fragmin	100 1.2±0.2	21.0±1.6***	28.50±9.63	
SH	100 10.2±2.6***	21.1±2.4***	28.98±14.86	
Saline	1.2±0.2	16.3±0.9		

** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs saline

Tab 6. Effect of LMWH sc on carotid thrombosis in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Drugs,	OT,	Inhibition,	ED ₅₀ ,
anti- X _a IU/kg	min	%	anti- X _a IU/kg
LMWH	50 17.2±1.5**	11.68±8.77	193
	100 20.0±2.2***	29.29±14.16	
	200 23.4±2.1***	50.91±13.31	
Fragmin	100 20.0±1.1***	29.04±7.22	
SH	100 17.6±1.9**	13.89±11.06	
Saline	15.5±0.9		

** $P<0.05$, *** $P<0.01$, vs saline

sc 后 3 h,LMWH 各剂量组和 Fragmin 组
均表现出抗血栓作用,与空白组比较有显著
性差异($P<0.05$, $P<0.01$),而 SH 的作用较
弱,与低剂量 LMWH(50 anti- X_a IU/kg)相似

($P>0.05$)。以血栓百分抑制率计算,LMWH
ED₅₀为 193 anti- X_a IU/kg(见表 6)。sc 与 iv 相
比,LMWH 各剂量组及 Fragmin 组均无显著
性差异($P>0.05$),而 SH 组则有显著性差异
($P<0.05$)。由以上结果可看出,LMWH 和
Fragmin sc 利用度较 SH 高。

2.6 对家兔颈外静脉血栓形成的影响

LMWH 有明显的抗静脉血栓作用,并随
剂量的增加而增强,与 Fragmin 相比,同等剂
量下抗血栓作用无显著差异($P>0.05$),而
与 SH 相比 LMWH 抗血栓作用较强(见表
7)。

Tab 7. Effect of LMWH iv on venous thrombosis in rabbits($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Drugs, anti- X _a IU/kg	Thrombus score						Mean score	Inhibition, %	ED ₅₀ , anti- X _a IU/kg
	1	2	3	4	5	6			
LMWH	50	4	3	2	4	4	3.3±0.8	10.8	91
	100	1	0	1	1	1	0.7±0.5***	81.9	
	200	0	0	0	0	0	0.2±0.4***	95.4	
Fragmin	100	0	0	1	1	1	0.5±0.5***	86.5	
SH	200	2	2	2	2	2	2.0±0.0***	45.9	
Saline		4	4	3	4	3	3.7±0.5		

** $P<0.01$, vs saline, *** $P<0.01$, vs SH

3 讨 论

有人认为^[13,14],SH 大剂量应用时能促使纤溶酶原激活物的释放,从而激活纤溶系统。在本文剂量范围内,没有显示 SH 和 LMWH 对纤溶系统的影响。

血栓性疾病是临床上常见的疾病,从形态上看,血栓可分为白色血栓、红色血栓和混合血栓。在实验中我们采用相应的动物实验模型全面地研究 LMWH 对以上三种形态血栓形成的影响,结果表明,LMWH 能有效地抑制各种血栓的形成(表 4,5,6,7)。

LMWH 在大鼠动-静脉旁路、大鼠颈动脉电流损伤(iv, sc)和家兔颈静脉血栓模型中均表现出良好的剂量依从性,ED₅₀分别为 159,185(iv), 193(sc), 91 anti- X_a IU/kg。在大鼠动-静脉旁路血栓模型中,形态学检查发现,空白组血栓色泽暗红,用药组血栓表面粗糙,成淡红色,可以认为用药组血栓红细胞和纤维蛋白的含量低,主要由血小板组成,因为 LMWH 无明显的抑制血小板聚集作用^[16],但可以抑制凝血酶对纤维蛋白原的作用,抑制纤维蛋白原的转化。LMWH 能有效地抑制静脉血栓的形成,并且 ED₅₀较小,因为,在静脉血栓形成过程中,凝血酶的激活是主要因素之一,由于 LMWH 有很强的抗 FX_a 作用,使得凝血酶的激活受到抑制,从而抑制血栓形成。在研究中还发现,sc LMWH 吸收完全,与 iv 同等剂量作用相似,而 SH 的作用弱。总之,由 SH 制备的 LMWH 能有效地防止血栓形成,对凝血系统的影响小,因此能成为一种

有效、安全的抗血栓新药。

参 考 文 献

- 1 Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, et al. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matri-bound antithrombin II and by gel filtration. *Thromb Res*, 1976,9:575
- 2 Danielson A, Raub E, Lindahl U, et al. Role of ternary complexes in which heparin binds both antithrombin and proteinase, in the acceleration of the reactions between antithrombin and thrombin of factor X_a. *J Biol Chem*, 1986, 261:15467
- 3 WO 1981,812376
- 4 U. S. Patent, 1984,4438261
- 5 Yin ET, Wessler S, Butler JV. A unique, practical, submicrogram-sensitive assay. *J Lab Clin Med*, 1973,2:298
- 6 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理学实验方法. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1991.1113
- 7 陈捷先. 临床血液病学. 第一版. 福州:福建科学技术出版社,1980.603
- 8 朱立红,王鸿利. 纤溶酶原和纤溶酶测定的临床应用. 中华医学检验杂志, 1989,12:42
- 9 Chandler AB. *In vitro* thrombotic coagulation of the blood. *Lab Invest*, 1958,7:110
- 10 Umetsu T, Sanai K. Effect of 1-methyl-2-mercapto-5-(3-pyridyl)-imidazole(KC-6141), an anti-aggregating compound, on experimental thrombosis in rats. *Thromb Haemost*, 1978,39:74
- 11 覃建民,李增,石山. 实验性体内血栓形成测定仪的研制和使用. 中国药理学通报, 1992,8:236
- 12 Holmer E, Mattsson C, Nilsson S. Anticoagulant and antithrombotic effects of heparin and low molecular weight heparin fragments in rabbits. *Thromb Res*, 1982,25:475
- 13 Vinazzer H, Stemberger A, Has S, et al. Influence of Heparin, of different heparin fractions and of a low molecular weight heparin-like substance on the mechanism of fibrinolysis. *Thromb Res*, 1982,27:341
- 14 Kudinov SA, Kolesnik LA, Makogonenko EM, et al. The effect of heparin on the proteolytic and fibrinolytic activities of plasmin(ogen) and fibrin clot lysis. *Diaklema*, 1989,54: 1881
- 15 Fabris F, Fussi F, Casonato A, et al. Normal and low molecular weight heparins: Interaction with human platelets. *Eur J Clin Invest*, 1983,13:125

Effect of Low Molecular Weight Heparin on Coagulation System and Thrombosis

Li Xiaoxiang, Zhao Ting, Li Naisan

Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract Low molecular weight haprin(LMWH) was obtained by controlled nitrous acid degradation of standard heparin(SH). It was demonstrated that 1)LMWH has less effect on coagulation system than SH; 2)The anti-thrombotic potency of LMWH was weaker, compared to that of SH, *in vitro*; 3)The effects of LMWH and Fragmin and SH on thrombosis *in vivo* were similar to one another. The ED₅₀ of LMWH in models of the arterovenous shunt, carotid thrombosis(iv, sc) and vein thrombosis were 159, 185(iv), 193(sc) and 91 X₂IU/kg, respectively. It was found that LMWH injected in vein and subcutaneously had the same effect on carotid thrombosis model, but not to standard heparin. The findings suggest that LMWH remains the anti-thrombotic effect of SH, decreases the side effect of SH, and is a potential anti-thrombotic agent.

Key words Standard heparin; Low molecular weight heparin; Anti-thrombosis

应用酶工程技术生产 1,6-二磷酸果糖

由王旻副教授主持的国家“八五”攻关课题 1,6-二磷酸果糖(FDP),是利用现代酶工程技术,从蔗糖生产 FDP。已完成了小试和中试。用该工艺生产 FDP 具有工艺稳定,三废少,工业成本较低的特点,其固定化酶半衰期>20 d,固定化酶表现活力(按湿细胞计算)>550 mg/d·g⁻¹,底物转化率达到 15%以上,产物提取重量总收率达 95%。

该项目于 1995 年 4 月取得国家二类新药证书和四类新药证书各一本。并于 1996 年 1 月通过中国科学院组织的专家验收。