

口服类肝素理化性质和药理活性的研究

程 骥, 钱之玉*, 何书英

(中国药科大学药理学教研室, 南京 210009)

【摘要】 目的: 制备口服类肝素样品并研究其理化性质、促脂酶释放活性和抑制血栓形成作用。方法: 猪十二指肠通过提取分离得到类肝素样品, 采用常规方法测定其抗 Xa 因子活性、活化部分凝血激酶时间 (APTT) 活性等各项理化性质, 采用比色测定法考察其促进肝脂酶 (HL) 和脂蛋白脂酶 (LPL) 释放活性, 并采用大鼠动静脉旁路血栓模型考察其口服给药对血栓形成的抑制作用。结果: 类肝素样品抗 Xa 因子活性 70.4 IU/mg, APTT 活性 33.8 IU/mg, FXa/FIIa 为 2.1, 促 HL 和 LPL 释放及抑制大鼠动静脉旁路血栓作用显著。结论: 类肝素样品具有显著的促 HL 和 LPL 释放及口服抑制血栓形成作用。

【关键词】 类肝素; 理化性质; 肝脂酶; 脂蛋白脂酶; 血栓

【中图分类号】 R 961 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)02-0163-04

目前与血栓形成有关的疾病发病率越来越高, 如得不到及时治疗, 其死亡率很高。这些疾病的抢救治疗, 如用溶栓药物尿激酶、组织型纤溶酶原激活剂等溶栓治疗时, 需用肝素等抗凝药物同时配合使用, 以防止血管的再栓塞, 而肝素出血副作用大, 抗血栓作用相对较小。进入 90 年代, 国内数家公司又瞄准了低分子肝素 (LMWH) 的市场, 低分子肝素与肝素相比, 生物利用度高, 半衰期长, 副作用小, 在一定范围内, 随分子量降低, 抗血栓作用逐渐增强^[1-2], 但目前低分子肝素制剂均为注射剂, 无口服剂型, 在一定程度上限制了它的应用, 因此口服类肝素产品的开发应用市场前景十分广阔。国际上先后有 Sulodexide、Mesoglycan 等类肝素产品面世, 效果良好^[3-8]。本实验从猪十二指肠中提取分离出类肝素物质, 从理化性质、促脂酶释放活性以及口服抑制血栓形成作用等方面对其进行了考察, 为开发口服有效的抑制血栓形成药物提供了依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

新鲜猪十二指肠, 经丙酮浸泡脱脂; 木瓜蛋白酶 (0.3 ~ 0.4 IU/mg), 进口分装, 由武汉生命技术有限公司提供; 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB), 批号 011124, 由上海凌峰化学试剂有限公司提供; 总蛋白定量试剂盒, 由南京建成生物研究所提供; 低

分子肝素标准品 (Anti-Xa 活性为 106.1 IU/ml, Anti-IIa 活性为 44.2 IU/ml), Council of Europe, European Pharmacopoeia, BP907-F67029 Strasbourg Cedex 1; Rotachrom HBPM/LMWH 试剂盒, C. K. PREST 试剂盒, 均由法国 Diagnostica Stago 公司提供; 正常人血浆, 由南京红十字血站提供; 低分子肝素, 由南京南大药业责任有限公司提供, 批号 20010117, Anti-Xa 效价 93.7 IU/mg; 伟素注射液 (含 Sulodexide 30 mg/ml), 批号 5453, 伟素胶囊 (含 Sulodexide 25 mg/颗), 批号 5548, 由意大利 Alfa Wassemann 公司提供; 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 主要仪器

HH-4 数显恒温水浴, 由常州国华电器有限公司生产; UV-9100 型紫外可见分光光度计, 由北京瑞利分析仪器公司生产。

1.3 动物

SD 大鼠, 由中国药科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK (苏) 2001-0001。

2 方法

2.1 类肝素的制备

称取绞碎猪十二指肠碱提 1 h。冷却后加入木瓜蛋白酶, 酶解 16 h 后, 用纱布过滤除去残渣, 滤液减压浓缩, 用氯仿处理两次, 收集水相, 水相加入 CTAB 溶液, 产生沉淀, 离心收集沉淀, 沉淀用热水

充分洗涤,将沉淀加入 0.4 mol/L NaCl 溶液中搅拌解离,离心收集沉淀,将沉淀加入 1.4 mol/L NaCl 溶液中搅拌解离,离心收集上清液,上清液以 3 倍体积甲醇醇沉,放置过夜,离心收集沉淀,甲醇洗 2 次,乙醚洗涤 1 次,真空五氧化二磷干燥。产品收率为 0.032%。

2.2 理化性质分析

2.2.1 葡萄糖醛酸含量 按 Bitter-Muir 卞啉法^[9]测定。

2.2.2 氨基葡萄糖含量 按 Elson-Morgan 法^[10]测定。

2.2.3 总硫酸基含量 按 Dogson-Price 法^[11]测定,样品用 1 mol/L HCl 100℃水解 2 h。

2.2.4 蛋白质含量 按试剂盒法测定。取 1 mg/ml 的蛋白标准品、样品溶液和蒸馏水(空白),各加入 CBBG₂₅₀显色剂 3 ml,于波长 595 nm 下,空白管调零,测定标准品和样品的吸光度,两者吸光度相比,即得蛋白质含量。

2.2.5 抗凝活性

抗 Xa 因子活性^[12] 使用 Rotachrom HBPM /IMWH 试剂盒,采用生色底物法,照生物检定统计法(中国药典 2000 年版二部附录 XI V)中量反应平行线测定法计算出样品的抗 Xa 因子活性。

APTT 活性^[13] 将低分子肝素标准品和类肝素样品用 Tris 缓冲液(pH 7.4)配制成 4 种一定浓度梯度的溶液,使用 C. K. PREST 试剂盒,取洁净干燥试管若干只,每管加入一种浓度的标准品或样品 0.1 ml,再分别加入正常人血浆 0.1 ml 和白陶土部分凝血活酶试剂 0.1 ml,混匀,37℃保温 3 min,加入 0.025 mol/L 氯化钙溶液 0.1 ml,立即摇匀,计时,观察凝结时间,用量反应平行线测定法计算出 APTT 活性,将抗 Xa 因子活性与 APTT 活性之值相比,得 FXa/FIIa 值。

2.3 对 LPL 和 HL 活性的影响^[14 15]

取 SD 大鼠,雄性,体重(194.71±5.20)g,随机分为 3 组(8 只/组),即①对照组(生理盐水 15 ml/kg)、②Sulodexide 组(1 mg/kg)和③类肝素组(1 mg/kg)。实验前大鼠禁食 16 h,用 3%戊巴比妥钠麻醉,心脏取血,iv 给药。30 min 后心脏取血,枸橼酸化全血(用 3.8%枸橼酸钠按全血:抗凝剂=9:1 混合),4℃离心 3500 r/min 10 min,得大鼠血浆。按文献法测血浆脂蛋白脂酶及肝脂酶活性,结果采用组

间 *t* 检验进行统计处理。

2.4 抑制血栓形成作用^[18 19]

取 SD 大鼠,雄性,体重(365.12±6.54)g,将大鼠随机分为 6 组(8 只/组),①空白对照组静脉注射等容量生理盐水,12 h 后开始 ig 给药,ig 等容量水 5 d,每日 2 次;②Sulodexide iv 组和③Sulodexide iv+ig 组分别 iv Sulodexide 10 mg/kg,12 h 后开始 ig,ig 5 d,每日 2 次,分别给等容量水和 Sulodexide 5 mg/kg;④类肝素 iv 组和⑤类肝素 iv+ig 低剂量组、⑥类肝素 iv+ig 高剂量组分别 iv 类肝素 10 mg/kg,12 h 后开始 ig,ig 5 天,每日 2 次,每次分别 ig 等容量水、类肝素 5 mg/kg 和类肝素 10 mg/kg;各组均于末次 ig 后 2 h 手术,大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠(1.5 ml/kg)麻醉,仰卧位固定,分离气管,插入一聚乙烯管(气管分泌物多时可通过此套管吸出),分离右颈总动脉和左颈外静脉。剪 1 根长 6 cm 的 4 号手术丝线,称重后放入三段式聚乙烯管中,使接触血液的丝线长 5 cm,剩下的 1 cm 从靠近动脉端的接头处露出来,以 50 IU/ml 的肝素生理盐水充满整个聚乙烯管。将静脉端插入左颈外静脉后,从动脉端准确地注入 50 IU/ml 的肝素生理盐水(1 ml/kg)抗凝,然后将动脉端插入右颈总动脉。手术完毕后打开动脉夹,计时,15 min 后中断血流,迅速取出丝线称湿重,并置 60℃烘箱 12 h 后称干重,同时从颈动脉取血,枸橼酸化全血,4℃离心 3500 r/min 10 min,得大鼠血浆,使用 C. K. PREST 试剂盒测定血浆 APTT,结果采用组间 *t* 检验进行统计处理。

3 结果

3.1 理化性质分析

葡萄糖醛酸含量、氨基葡萄糖含量、总硫酸基含量、蛋白质含量、抗 Xa 因子和 APTT 活性结果见表 1。

Tab 1. Physicochemical properties of heparinoid

Item	Content
Uronic acids (g/100g dry wt.)	19.855
Hexosamines (g/100g dry wt.)	22.985
Total sulfate (g/100g dry wt.)	18.980
Proteins (g/100g dry wt.)	5.263
Anti-Xa (IU/mg)	70.4
APTT (IU/mg)	33.8
FXa/FIIa	2.1

3.2 对 LPL 和 HL 活性的影响

Sulodexide 组与对照组相比 HL 和 LPL 活性均有极显著性差异($P<0.001$, $P<0.01$), 类肝素组在同样剂量下与对照组相比 HL 活性有极显著性差异($P<0.001$), LPL 活性有显著性差异($P<0.05$), 而两种酶活性均与 Sulodexide 组无显著性差异($P>0.05$)。结果见表 2。

Tab 2. Effects of heparinoid on activity of HL and LPL in plasma of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Groups	LPL(FFAUeq/ml plasma $\cdot$ h ⁻¹)	HL(FFAUeq/ml plasma $\cdot$ h ⁻¹)
Control	0.061 $\pm$ 0.063	0.264 $\pm$ 0.046
Sulodexide (1mg/kg)	0.224 $\pm$ 0.133 ^{**}	0.642 $\pm$ 0.204 ^{***}
Heparinoid(1mg/kg)	0.161 $\pm$ 0.101 [*]	0.628 $\pm$ 0.166 ^{***}

^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ vs control group

3.3 抑制血栓形成作用

Tab 3. Effects of heparinoid on the thrombosis in the arterovenous shunt model in rats($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Groups	Routes	Thrombus(mg)		Inhibition(%)		APTT (s)
		Wet wt.	Dry wt.	Wet wt.	Dry wt.	
Control		88.04 $\pm$ 7.92	36.98 $\pm$ 3.20	—	—	42.53 $\pm$ 3.22
Sulodexide	iv.	82.32 $\pm$ 8.58	34.58 $\pm$ 2.76	6.49	6.49	42.39 $\pm$ 2.87
Sulodexide	iv. + ig.	62.61 $\pm$ 7.28 ^{***}	24.81 $\pm$ 4.67 ^{***}	28.88	32.89	43.08 $\pm$ 3.50
Heparinoid	iv.	84.46 $\pm$ 7.92	35.39 $\pm$ 4.43	4.06	4.29	42.83 $\pm$ 3.14
Heparinoid(low dose)	iv+ ig.	67.54 $\pm$ 9.48 ^{***}	27.14 $\pm$ 6.11 ^{**}	23.28	26.60	43.75 $\pm$ 3.86
Heparinoid(high dose)	iv+ ig.	57.02 $\pm$ 5.69 ^{***}	22.81 $\pm$ 4.35 ^{***}	35.23	38.30	44.64 $\pm$ 3.32

^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ vs control group.

现多以 FXa/FIIa 表示药物的抗血栓潜力, 通常该比值越大, 抗血栓作用越强, 出血倾向越小, 肝素的 FXa/FIIa 比值为 1, 低分子肝素为 1.5~4^[1]。类肝素的 FXa/FIIa 比值为 2.1, 提示其抗血栓作用安全有效。

参照文献[6, 8], 在抑制血栓形成实验中采取先 iv 后 ig 的给药方式, 首先 iv 使血药浓度达到高血药浓度状态, 继而口服维持, 实现抑制血栓形成的长期作用。结果证实, 类肝素 iv+ig 低、高剂量均组能显著地抑制大鼠动静脉旁路血栓的形成, 与 Sulodexid iv+ig 组无显著性差异, 并且类肝素 iv 组和 Sulodexide iv 组对于血栓形成的抑制作用与对照组无显著性差异, 提示口服类肝素有效, 可实现长期口服用药抑制血栓形成的作用, 通过对各组 APTT 的考察, 可认为类肝素对凝血系统影响较小, 这与前面类肝素样品抗凝活性测定结果相吻合。

类肝素 iv+ig 低、高剂量组的血栓湿重、干重与对照组相比均有极显著性差异($P<0.01$, $P<0.001$), 且与 Sulodexide iv+ig 组的作用无显著性差异($P>0.05$); 而类肝素 iv 组和 Sulodexide iv 组血栓湿重、干重均与对照组无显著性差异($P>0.05$); 各给药组 APTT 均与对照组无显著性差异($P>0.05$), 结果见表 3。

4 讨论

Sulodexide 可以促进 HL 和 LPL 的释放, 其促 LPL 释放的活性可作为其活性单位(Lipoproteinlipase Releasing Units, LRU), 本实验中类肝素能显著提高大鼠血浆中 HL 和 LPL 活性, 其促脂酶释放活性作用与相同剂量 Sulodexide 组无显著性差异, 提示其可以改善脂质代谢, 对血栓栓塞性疾病有预防和治疗作用。

结果表明, 本文所制类肝素在葡萄糖醛酸、氨基葡萄糖、总硫酸基、总蛋白含量、抗 Xa 因子活性和 APTT 活性等理化性质上与 Sulodexide 的文献报道极为接近^[6, 7], 提示两者可能具有相似的结构和成分。故本实验所制备的类肝素样品有望开发为一种安全有效的口服抗血栓药物。

参考文献

[1] 张天民(Zhang TM), 崔慧斐(Cui HF), 王凤山(Wang FS), 等. 高抗血栓活性的低分子肝素[J]. 中国医药工业杂志(Chin J Pharmaceuticals), 1994, 25(7): 301-309

[2] Hirsh J. low molecularweight heparin[J]. Thromb Haemost, 1993, 70(1): 204-207.

[3] Gervasi GB, Bartoli C, Carpita G. A new low molecular weight heparan sulphate antagonizes kappa-carrageenan-induced thrombosis in rats[J]. Pharmacol Res, 1991, 24(1): 59-63.

[4] Bhandaru R, Chakravarthi S, Bhandaru RR, et al. Study of chemical

- and biology properties of a fraction of sulodexide: a heparin-like glycosaminoglycan[J] . *Atherosclerosis*, 1986 **60**: 141-149.
- [5] Nicola Volpi. Fractionation of heparin, dermatan sulfate and chondroitin sulfate by sequential precipitation; a method to purify a single glycosaminoglycan species from a mixture[J] . *Anal Biochem*, 1994, **218**: 382-391.
- [6] J. Harenberg. Review of pharmacodynamics, pharmacokinetics, and therapeutic properties of sulodexide[J] . *Med Res Rev*, 1998, **18**(1): 1-20.
- [7] 唐 怡(Tang Y), 李耀功(Li YG). 伟素—新型低分子肝素类药物[J] . 中国新药杂志(*Chin J New Drugs*), 1999 **8**(6): 414-415.
- [8] Frederrick AO. Pharmacological actions of sulodexide[J] . *Semin Thromb Hemost*, 1998, **24**(2): 127-138.
- [9] Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction[J] . *Anal Biochem*, 1962, **4**: 330-334.
- [10] Elson LA, Thomas W, Morgan J. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine[J] . *Biochem J*, 1933, **27**: 1824-1829.
- [11] Dodgson KS, Price RG. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides[J] . *Biochem J*, 1962, **84**: 106-110.
- [12] *British Pharmacopoeia*[S] . 1998: 1335-1338.
- [13] *British Pharmacopoeia*[S] . 1998: 321-322.
- [14] 张 蓉(Zhang R), 刘 宇(Liu Y), 刘秉文(Liu BW). 血浆脂蛋白脂酶及肝脂酶的比色测定法[J] . 华西医科大学学报(*J West China Univ Med Sci*), 1996, **27**(1): 106-110.
- [15] 张均田(Zhang JT)主编. 现代药理实验方法学[M] . 下册. 北京: 北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1998: 1301-1304.
- [16] 张均田(Zhang JT)主编. 现代药理实验方法学[M] . 下册. 北京: 北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1998: 1216-1217.
- [17] 尚 丽(Shang L), 周序斌(Zhou XB), 张黎华(Zhang LH). 肝素非抗凝的药理作用研究进展[J] . 中国药理学通报(*Chin Pharmacol Bull*), 1995 **11**(4): 366-370.

Experimental Research of Physicochemical Properties and Pharmacological Action of a Peroral Heparinoid

CHENG Ji, QIAN Zhi-Yu, HE Shu-Ying

Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

【ABSTRACT】 AIM: To study the physicochemical properties, antilipaemic activity and anti-thrombotic effect of a domestic porcine duodenum heparinoid. **METHOD:** The heparinoid was obtained from porcine duodenum by extraction and purification. Its physicochemical properties such as anti-Xa and APTT activity were studied and examined; the effects on activities of HL and LPL in plasma of rats were studied by chromometry and the effect on thrombosis was examined on arterovenous shunt model in rats. **RESULT:** The anti-Xa and APTT activities were 70.4 and 33.8 IU/mg, respectively. FXa/FIIa was 2.1. The heparinoid showed markedly the promoting release of HL and LPL activities in plasma of rats and opposing the incidence of thrombosis on arterovenous shunt model of rats. **CONCLUSION:** The heparinoid has shown significantly antilipaemic effect and preventing thrombosis on animal thrombotic model.

【KEY WORDS】 Heparinoid; Physicochemical properties; LPL; HL; Thrombosis