

D-聚甘酯抗凝活性与凝血因子X/II灭活度比值相关性研究

石杰^{1,2}, 陈安进^{1,2}, 姜新道¹, 张新惠¹, 王本坚¹ (1.青岛市市立医院, 山东 青岛 266071; 2.中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要: 目的 通过探索 D-聚甘酯抗凝活性与 X/II 因子灭活度比值的相关性, 推断其可能的抗凝抗栓机制, 为临床更加合理应用该药提供参考。方法 设 4 个不同 D-聚甘酯剂量组以及空白、肝素钠 2 个对照组, 每组均测定凝血酶原时间(PT), 凝血活酶时间(APTT)以及 II 因子、X 因子的活性, 并计算 X/II 的灭活度比值。结果 在 50~150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 随着 D-聚甘酯浓度的增加, 其抗凝活性增强, X/II 因子灭活度比值升高。结论 D-聚甘酯在发挥抗凝活性时, 可能的机制是以灭活凝血酶活性为主, 而不是以抑制凝血酶原产生为主。

关键词: D-聚甘酯; 抗凝活性; 灭活度比值; 相关性

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)08-0694-03

Relationship Between Anticoagulation and Deactivation Ratio on X/II Factor of D-polymannuronic acid

SHI Jie^{1,2}, CHEN Anjin^{1,2}, JIANG Xindao¹, ZHANG Xinhui¹, WANG Benjian¹ (1.Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, China; 2.Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate relationship between anticoagulation and deactivation ratio on X/II factor of D-polymannuronic acid and estimate the anticoagulation mechanism. **METHODS** Plasma sample was divided into 6 groups: four D-polymannuronic acid groups in different doses, one blank group and one heparin sodium group. APTT, PT and the activity of factor II, X in each group were determined, then the deactivation ratio on X/II factor was calculated. **RESULTS** The anticoagulation as well as the deactivation ratio on X/II factor was enhanced with the increased concentration of D-polymannuronic acid of 50–150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** The possible anticoagulation mechanism of D-polymannuronic acid is deactivating the activity of thrombin rather than inhibiting thrombinogen.

KEY WORDS: D-polymannuronic acid; anticoagulation; deactivation ratio; relationship

D-聚甘酯(D-polymannuronic acid)是由中国海洋大学首创研制的国家一类新药, 是海洋生物褐藻酸经一系列降解、分级、纯化、酯化、硫酸化而制得的一种低分子量的多糖类化合物。临床主要用于心脑血管系统栓塞性疾病的治疗和预防。中国海洋大学前期已完成该药在动物体内的药效学研究、动物和人体药动学研究, 以及 I 期临床安

全性及耐受性研究^[1-6]。曾有报道通过对不同结构及糖单位数目的肝素药理作用的研究, 发现抗凝活性与药物对因子 II 和因子 X 的灭活度不同比值密切相关^[7-9]。凝血因子是参与血液凝固过程的各种蛋白质组分, 因子 II 是一种单链糖蛋白而因子 X 则是一种双链糖蛋白, 它们活性的大小均与凝血强度密切相关。其生理作用是在血管出血时被

基金项目: 中国海洋大学海洋药物教育部重点实验室开放基金资助项目[KLMD(OUC)200808]

作者简介: 石杰, 女, 博士, 主任药师 Tel: (0532)88905350 E-mail: jieshiqd68@yahoo.com.cn

激活, 和血小板粘连在一起参与凝血过程。因而研究某种药物对于凝血因子的灭活度, 可以反映该药物抗凝抗栓作用的强弱。

目前国内外有关肝素以外其他药物与因子Ⅱ和因子Ⅹ的相关研究报道较少。本课题拟通过试验探索 *D*-聚甘酯具有最大抗凝活性时Ⅹ/Ⅱ因子灭活度比值, 进而确定 *D*-聚甘酯抗凝抗栓的具体机制, 为临床更加合理应用该药提供参考。

1 材料及仪器

乏Ⅱ因子血浆试剂和乏Ⅹ因子血浆试剂(美国 Fisher Scientific 公司); *D*-聚甘酯(中国海洋大学, 批号: 20081025); 肝素钠(江苏万邦生化医药有限公司, 批号: 20090316); STA COMPACT 血凝分析仪(法国 Stago Compact 公司)。

2 方法与结果

2.1 待测血浆配制

精密称取 *D*-聚甘酯, 加入到空白血浆(青岛市中心血站)中, 配制 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 4 个剂量组待测血浆各 5 mL; 精密量取肝素钠, 配制 0.6 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素钠对照组血浆 5 mL; 另取 5 mL 空白血浆为阴性对照组。

2.2 凝血酶原时间(PT)、凝血活酶时间(APTT)的测定

取“2.1”项下待测血浆每份 2 mL, 以 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 置血凝分析仪中

测定 PT, APTT, 每份样品均检测 2 次, 取均值。

2.3 Ⅱ, Ⅹ因子灭活度的测定^[10-11]

2.3.1 标准曲线的配制 按照 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 的浓度分别稀释乏Ⅱ因子或乏Ⅹ因子溶液, 配制标准活度为 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% 的乏Ⅱ因子或乏Ⅹ因子溶液标准溶液, 并测定其 PT 值, 绘制标准曲线。

2.3.2 Ⅱ, Ⅹ因子灭活度测定 分别抽取待测血浆每份 1 mL 分别加入乏Ⅱ因子或乏Ⅹ因子 1 mL, 以 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min 离心, 取上清液, 置血凝仪中测定 PT 值。

2.4 结果

2.4.1 标准曲线 按“2.3.1”项下, 以百分活度对 PT 线性回归, 乏Ⅱ因子标准曲线为 $Y=-0.269\ 6X+43.908(r=0.991\ 9)$, 乏Ⅹ因子标准曲线为 $Y=-0.322\ 1X+46.763(r=0.995\ 1)$ 。

2.4.2 Ⅱ, Ⅹ因子灭活度测定结果 以“2.3.2”测得的 PT 值代入“2.4.1”项下线性方程计算相应的Ⅱ, Ⅹ因子灭活度, 结果见表 1。

D-聚甘酯随给药剂量增加, 其 PT, APTT 时间延长, 即抗凝作用增强。150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 *D*-聚甘酯抗凝作用与 0.6 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的肝素钠相当。在 50~150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 随 *D*-聚甘酯抗凝活性增强, Ⅹ因子与Ⅱ因子灭活度比值逐渐增加, 在比值为 2.5 时抗凝作用最强。

表 1 各组 PT 值、APTT 值及Ⅹ、Ⅱ因子灭活度结果

Tab 1 Results of PT, APTT and deactivation ratio on Ⅹ/Ⅱ factor of different groups

组 别	Ⅱ因子灭活/%	Ⅹ因子灭活/%	Ⅹ/Ⅱ	PT/s	APTT/s
阴性对照组	4.6	3.8	0.826 1	14.6	66.5
<i>D</i> -聚甘酯 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	26.5	32.1	1.211 3	23.5	86.6
<i>D</i> -聚甘酯 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	29.1	64.1	2.202 7	41.2	114.6
<i>D</i> -聚甘酯 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	32.8	82.1	2.503 0	63.1	139.5
<i>D</i> -聚甘酯 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	—	—	—	>100	>180
肝素钠对照组	32.1	80.3	2.501 6	67.9	147.2

3 讨论

本实验为平行对照的体外研究。据文献[3-4]报道, *D*-聚甘酯在最大试验剂量下, 人体内的最大血药浓度约为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 因此本次实验设 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 共 4 个剂量组。另据文献[12]报道, 肝素钠在正常用量下, 人体内的最大血药浓度约为 0.5~0.7 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 因此本实验以 0.6 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素钠为阳性对照组。另设阴性对照组。

从实验结果可以看出, 在 50~150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,

D-聚甘酯的抗凝活性逐渐增强, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的抗凝活性与 0.6 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素钠的抗凝活性相当。由于 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量组 *D*-聚甘酯的 PT(>100 s)和 APTT(>180 s)均超出检测范围, 因此均未能检测出。但从中可以看出, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 *D*-聚甘酯具有非常强的抗凝活性, 提示 *D*-聚甘酯在临床应用时给药剂量不能过大, 也不能肯定在 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上的浓度时, Ⅹ/Ⅱ因子灭活度比值是否随抗凝活性的增高而增高。本实验中, 肝素钠的Ⅹ/Ⅱ因

子灭活度比值与文献[12]报道一致。

根据凝血机理的瀑布学说,凝血是一系列凝血因子相继酶解激活的过程,并且每步酶解反应均有放大效应。内外凝血途径并非截然无关而是互有联系,相互促进。两条途径的差别在于启动方式和参加凝血因子不完全相同,两条途径都能激活X因子,形成一条最终生成凝血酶和纤维蛋白凝块的共同途径;参与两条途径的某些凝血因子能相互激活,将两条凝血途径联系起来。最后都能激活因子X,进而激活因子II,形成凝血酶,溶解纤维蛋白原,促进纤维蛋白凝块的形成。凝血因子II和因子X在凝血过程中处于内外源性凝血途径和共同凝血途径之间,是构成中间凝血途径至关重要的两个因子,有重要的生理和病理意义。前期对该药的有关药理学研究表明,该药是一个多作用靶点的药物^[1],对因子II和X均有一定的作用,本实验中,随D-聚甘酯抗凝活性增强,X/II因子灭活度比值升高,说明D-聚甘酯对X因子的灭活程度高于对II因子的灭活程度。提示D-聚甘酯在发挥抗凝活性时,可能的机制是以灭活凝血酶活性为主,而不是以抑制凝血酶原产生为主。

REFERENCES

- [1] FANG Y, WANG R, GENG M Y, et al. A study on pharmacodynamics of APTT elongation caused by D-polymannuronic acid tablets [J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物), 2003, 20(3): 48-50.
- [2] FANG Y, CHEN K, LIANG B B, et al. Tolerance of single dose of D-polymannuronic acid injection in Chinese healthy volunteers [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),

- 2004, 20(4): 284-286.
- [3] WANG R, FANG Y, CAI D, et al. Pharmacokinetics of D-polymannuronic acid injection after a single dose in Chinese healthy volunteers [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2006, 22(3): 192-194.
- [4] WANG S M, GENG M Y, WANG R, et al. Determination of D-polymannuronic acid in human plasma by biologic analysis method [J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物), 2003, 20(3): 42-44.
- [5] LANG S Y, LI X M, WANG R, et al. Phase I clinical trial of single oral dose of D-polymannuronic acid tablets [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2003, 12(4): 288-291.
- [6] LI X M, LANG S Y, WANG R, et al. Phase I safety and tolerability study of multiple oral dosing D-polymannuronic acid tablets in healthy volunteers [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2003, 19(3): 178-180.
- [7] LARSON P J, CAMIRE R M, WONG D, et al. Structure/function analyses of recombinant variants of human factor Xa: factor Xa incorporation into prothrombinase on the thrombin activated platelet surface is not mimicked by synthetic phospholipid vesicles [J]. Biochemistry, 1998, 37(14): 5029-5038.
- [8] RUDOLPH A E, MULLANE M P, PORCHE S R, et al. The role of the factor X activation peptide: a deletion mutagenesis approach [J]. Thromb Haemost, 2002, 88(5): 756-762.
- [9] RUDOLPH A E, PORCHE-SORBET R, MILETICH J P. Definition of a factor Va binding site in factor Xa [J]. J Biol Chem, 2001, 276(7): 5123-5128.
- [10] JIANG H, WANG X, LIAO J, et al. The detection of FII, FVII active for clinical application [J]. Chin J Thromb Hemost(血栓与止血学), 2007, 13(3): 121-123.
- [11] REBELLO S S, BENTLEY R G, MORGAN S R, et al. Antithrombotic efficacy of a novel factor Xa inhibitor, FXV673, in a canine model of coronary artery thrombolysis [J]. Br J Pharmacol, 2001, 133(7): 1190-1198.
- [12] VOLPI N, CUSMANO M, VENTURELLI T. Qualitative and quantitative studies of heparin and chondroitin sulfates in normal human plasma [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1243(1): 49-58.

收稿日期: 2010-11-25