

岩藻聚糖硫酸酯 FV 对大鼠的抗血栓作用研究

闫晨¹, 邸志权², 朱振娜², 霍璇², 安梦培², 冯贻东³, 申秀萍², 胡金芳^{2*}

1. 天津医科大学总医院 药剂科, 天津 300052

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

3. 深圳市海王生物工程股份有限公司, 广东 深圳 518057

摘要: 目的 探讨岩藻聚糖硫酸酯 FV 对大鼠的抗血栓作用。方法 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、岩藻聚糖硫酸酯 FV 20、10、5、2.5 mg/kg 组和低分子肝素钙注射液 (LMWHC) 213 IU/kg 组, 每组各 10 只。分别在下腔静脉血栓模型、体外血栓模型和动静脉旁路血栓模型中研究 FV 的抗血栓作用, 比较血栓干湿质量并计算血栓抑制率。结果 FV 20、10、5、2.5 mg/kg 能够显著降低大鼠下腔静脉血栓、体外形成的血栓、动静脉旁路中血栓的干湿质量, 对血栓湿质量的抑制率最高可达 97.4%、94.3%、51.2%, 对血栓干质量的抑制率最高可达 91.8%、96.6%、64.0%, 有明显的抑制血栓形成作用。结论 FV 能够抑制血栓形成, 量效关系好, 具有开发为抗血栓药的良好前景。

关键词: 岩藻聚糖硫酸酯 FV; 抗血栓; 下腔静脉血栓模型; 体外血栓模型; 动静脉旁路血栓模型

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)06-1947-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.07.002

Antithrombotic effect of fucoidan from fucus vesiculosus FV on rats

YAN Chen¹, DI Zhi-quan², ZHU Zhen-na², HUO Xuan², AN Meng-pei², FENG Yi-dong³, SHEN Xiu-ping², HU Jin-fang²

1. Department of Pharmacy, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Assessment Co. Ltd, Tianjin 300301, China

3. Shenzhen Haiwang Bioengineering Co., Ltd, Shenzhen 518057, China

Abstract: Objective To explore the antithrombotic effect of fucoidan from fucus vesiculosus FV on rats. **Methods** Wistar rats (60) were randomly divided into control group, FV 20, 10, 5, and 2.5 mg/kg groups, and Low-Molecular-Weight Heparins Calcium Injection (LMWHC) group, and each group had 10 rats. The anti-thrombotic effects of FV were studied in inferior vena cava thrombosis model, external thrombosis model, and arteriovenous bypass thrombosis model. Dry and wet mass of thrombosis were compared, and the inhibition rate of thrombosis was calculated. **Results** FV 20, 10, 5, and 2.5 mg/kg could significantly reduce the wet weight and dry mass of inferior vena cava thrombosis, external thrombosis, thrombosis in arteriovenous bypass in rats. The highest inhibition rate of wet mass of thrombosis was 97.4%, 94.3%, and 51.2%, and the highest inhibition rate of dry mass of thrombosis was 91.8%, 96.6%, and 64.0%. **Conclusion** FV can inhibit the produce of thrombosis, and has a good dose-effect relationship. It has a good prospect to be developed as antithrombotic drugs.

Key words: fucoidan from fucus vesiculosus FV; anti-thrombosis; inferior vena cava thrombosis model; external thrombosis model; arteriovenous bypass thrombosis model

由血栓引起的急性心肌梗死、脑卒中等心脑血管疾病, 严重危害着人类健康和生命。从海洋生物体内寻找和开发抗凝血和抗血栓活性物具有广泛的应用前景。随着人们对海洋多糖抗凝血、抗血栓、

降血脂及其他药理活性研究的不断深入, 多糖已成为生物医药和化学领域共同关注的热点, 硫酸多糖因其具有强阴离子性, 可表现出不同程度的抗凝血活性^[1-2]。岩藻聚糖硫酸酯是从海带等褐藻中提取出

收稿日期: 2019-05-27

基金项目: 国家科技重大新药创制项目 (2015ZX09501004); 天津市科技计划项目 (17ZXXYSY00020)

作者简介: 闫晨, 主管药师, 硕士, 从事药品调剂、药物分析、医院制剂等工作。E-mail: yanchen2@sina.com

*通信作者 胡金芳, 研究员, 硕士, 从事药理学、毒理学研究。E-mail: hujf@tjipr.com

来的一种相对分子质量较高的水溶性杂多糖，通过一定的方法将其降解得到了一种低相对分子质量的岩藻聚糖硫酸酯 FV，平均相对分子质量为 11 000~15 000，易溶于水，拟将其开发成治疗周围静脉血栓药，本研究主要研究岩藻聚糖硫酸酯 FV 对大鼠的抗血栓作用。

1 试验材料

1.1 试验动物

SPF 级 Wistar 大鼠，雄性，体质量 180~200 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK(京)2012-0001。饲养于天津药物研究院新药评价有限公司动物实验楼(屏障环境，AAALAC 认证)。温度 20~26 °C，相对湿度 40%~70%，不少于 15 次/h 全新风，昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h。

1.2 药物与试剂

FV，产品批号 20120301，由深圳海王药业有限公司提供，平均相对分子质量为 11 000~15 000；低分子量肝素钙注射液(LMWHC)，产品批号 12105049，规格 0.4 mL:4 100 AxalIU，由葛兰素史克提供。

1.3 主要仪器

G&G T2000 型电子天平由美国双杰兄弟(集团)有限公司提供；PL203 型电子天平，由梅特勒托利多仪器(上海)有限公司提供；SDZ-A1 型体外血栓形成仪由无锡县电子仪器二厂提供；HPX-9052MBE 型电热恒温培养箱由上海博迅实业有限公司医疗设备厂提供。

2 方法

2.1 FV 对大鼠下腔静脉血栓形成的抑制作用

前期预试验对 FV 的剂量及作用时间做了探索，最终将 FV 的剂量设定为 20、10、5、2.5、1.25、0.63 mg/kg，LMWHC 的临床日使用量为 38 IU/kg，人按 60 kg 计，大鼠按 200 g 计，按体表面积折算大鼠的临床等效剂量为 213 IU/kg，依此对其设定剂量进行本研究。

参考 Reyers 法^[3]将 Wistar 大鼠随机分为对照组、FV 20、10、5、2.5 mg/kg 组和 LMWHC 213 IU/kg 组，每组 10 只，给药体积为 5 mL/kg。大鼠以 1% 戊巴比妥钠 5 mL/kg 腹腔注射麻醉后，尾静脉给予相应受试品，对照组给予生理盐水。15 min 后大鼠腹部碘伏消毒，沿腹正中切开大鼠腹壁，分离下腔静脉，并于左肾静脉下方预置丝线结扎下腔静脉，

关闭缝合腹腔，结扎 4 h 后重新打开腹腔，于结扎线下方 2 cm 处夹闭血管，同时结扎静脉侧枝，纵行剖开血管，观察有无血栓形成，若血栓形成，用滤纸吸去残血称血栓湿质量后，放置于烘箱内烘干，再称量血栓干质量。计算血栓抑制率(IR)。

$$IR = (\text{对照组血栓质量} - \text{给药组血栓质量}) / \text{对照组血栓质量}$$

2.2 对大鼠体外血栓形成的抑制作用

参考 Chandler 体外血栓法^[4]将 Wistar 大鼠随机分为对照组、FV 20、10、5、2.5 mg/kg 组和 LMWHC 213 IU/kg 组，每组 10 只，给药体积为 5 mL/kg。大鼠以 1% 戊巴比妥钠 5 mL/kg 腹腔注射麻醉后，尾静脉给予相应受试品，对照组给予生理盐水，15 min 后沿腹正中切开大鼠腹壁，腹主动脉迅速采血 1 mL 注入硅化的塑料管中放入血栓形成仪中，于 37 °C 下 18 r/min 旋转 15 min 后自环内倾出血栓，用滤纸吸干残血，称取血栓湿质量，血栓放置于烘箱内烘干再称量血栓干质量。计算血栓抑制率(IR)。

$$IR = (\text{对照组血栓质量} - \text{给药组血栓质量}) / \text{对照组血栓质量}$$

2.3 对大鼠动静脉旁路血栓形成的抑制作用^[5-6]

依完全随机法将 Wistar 大鼠分为对照组、FV 20、10、5、2.5 mg/kg 组和 LMWHC 213 IU/kg 组，每组 9 只，给药体积为 5 mL/kg。大鼠以 1% 戊巴比妥钠 5 mL/kg 腹腔注射麻醉后，尾静脉给予相应受试品，对照组给予生理盐水。颈部碘伏消毒，仔细分离右侧颈总动脉和左侧颈外静脉，颈外静脉先结扎静脉远心端，于近心端剪开一小口，将事先准备好聚乙烯管(管中放置一根预先称重的 4 号缝合线约 6 cm，并将 50 U/mL 肝素溶液充满管腔)向近心端插入并结扎固定。右侧颈总动脉先用血管夹夹住近心端，剪开一个小口，将管向近心端插入并结扎固定。给药 15 min 后放开血管夹计时 15 min，之后将线取出称量湿质量、干质量。计算血栓抑制率(IR)。

$$IR = (\text{对照组血栓质量} - \text{给药组血栓质量}) / \text{对照组血栓质量}$$

2.4 统计学方法

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 20.0 统计软件分析。先进行方差齐性检验，方差齐时以单因素方差分析进行整体比较，两两比较采用 *t* 检验；方差不齐采用非参数检验进行整体比较，两两比较采用 Kruskal-Wallis 检验。

3 结果

3.1 对大鼠下腔静脉血栓形成的抑制作用

与对照组比较, FV 20、10、5、2.5 mg/kg 组均能够明显降低大鼠下腔静脉的血栓湿质量和干质量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 阳性药 LMWHC 组能够明显降低大鼠下腔静脉的血栓干湿质量 ($P < 0.01$)。FV 对血

栓湿质量的抑制率最高可达 77.3%, 对血栓干质量的抑制率最高可达 74.9%。剂量相关性的线性拟合方程分别为 $Y = -0.377X + 11.70$ ($r = 0.978$)、 $Y = -0.173X + 5.62$ ($r = 0.901$), 剂量相关性较好, 提示 FV 有明显的抑制静脉血栓形成的作用。FV 对大鼠下腔静脉血栓形成的影响见表 1。

表 1 FV 对大鼠下腔静脉血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of FV on inferior vena cava thrombosis model of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血栓湿质量/mg	IR _{湿质量} /%	血栓干质量/mg	IR _{干质量} /%
对照	—	19.3±9.3	—	9.7±5.0	—
LMWHC	213 IU·kg ⁻¹	2.7±3.2**	86.2	1.0±0.8**	89.9
FV	20	4.4±3.2**	77.3	2.4±1.2**	74.9
	10	7.6±5.8**	60.7	3.2±2.2**	66.5
	5	9.5±6.7*	50.7	4.8±3.1*	49.8
	2.5	11.3±7.0*	41.5	5.5±2.3*	43.2

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 FV 对大鼠体外血栓形成的抑制作用

与对照组比较, FV 20、10、5、2.5 mg/kg 组均能够明显降低大鼠体外形成的血栓湿质量 ($P < 0.05$ 、 0.01), FV 20、10、5 mg/kg 组均能够明显降低大鼠体外形成的血栓干质量 ($P < 0.05$ 、 0.01)。阳性药 LMWHC 组能明显降低大鼠体外形成的血栓干湿质量 ($P < 0.01$)。FV 对血栓湿质量的抑制率最

高可达 94.3%, 对血栓干质量的抑制率最高可达 96.6%。剂量相关性的线性拟合方程分别为 $Y = -0.002X + 0.061$ ($r = 0.997$)、 $Y = -0.0001X + 0.015$ ($r = 0.768$), 血栓湿质量的 r 值为 0.997, 剂量相关性明显, 而血栓干重质量的 r 值为 0.768, 剂量相关性稍差, 提示 FV 具有抑制体外血栓形成作用。见表 2。

表 2 FV 对大鼠体外血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of FV on the external thrombosis model of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血栓湿质量/mg	IR _{湿质量} /%	血栓干质量/mg	IR _{干质量} /%
对照	—	133.3±83.3	—	26.6±20.0	—
LMWHC	213 IU·kg ⁻¹	13.2±20.6**	90.1	5.9±3.1**	95.5
FV	20	7.6±12.1**	94.3	4.5±3.2**	96.6
	10	33.2±16.9**	75.1	8.5±3.0*	93.6
	5	47.0±16.5**	64.7	9.6±2.4*	92.8
	2.5	55.6±19.4*	58.3	16.8±13.6	87.4

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.3 FV 对大鼠动静脉旁路血栓形成的抑制作用

与对照组比较, FV 20、10、5、2.5 mg/kg 组均能够明显降低大鼠动静脉旁路中的血栓湿质量 ($P < 0.01$), FV 20、10、5 mg/kg 组均能够明显降低大鼠动静脉旁路中的血栓干质量 ($P < 0.01$), 阳性对照药 LMWHC 组能明显降低大鼠动静脉旁路中的血栓干湿质量 ($P < 0.01$)。FV 对血栓湿质量的抑制率最

高可达 51.2%, 对血栓干质量的抑制率最高可达 64.0%, 提示 FV 具有显著抑制动静脉旁路血栓形成的作用。剂量相关性的线性拟合方程分别为 $Y = -0.345X + 26.38$ ($r = 0.850$)、 $Y = -0.097X + 3.28$ ($r = 0.655$), r 值分别为 0.850、0.655, 提示抑制血栓湿质量和干质量的剂量相关性均稍差。FV 对大鼠动静脉旁路血栓的影响见表 3。

表3 FV对大鼠动静脉旁路血栓的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effects of FV on arteriovenous bypass thrombosis model of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血栓湿质量/mg	IR _{湿质量} /%	血栓干质量/mg	IR _{干质量} /%
对照	—	41.2±10.6	—	4.4±1.5	—
LMWHC	213 IU·kg ⁻¹	19.0±6.2**	53.9	1.6±0.8**	63.0
FV	20	20.1±3.9**	51.2	1.6±0.7**	64.0
	10	21.6±11.2**	47.7	2.0±0.5**	55.1
	5	24.2±12.9**	41.2	2.3±1.4**	48.1
	2.5	26.7±4.8**	35.3	3.7±1.3	15.1

与对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

血栓性疾病是一类严重危害人类健康的疾病,其发病率和死亡率都很高,目前国内外都在寻找组成均一、活性专一,且相对分子质量小、抗凝血活性低而抗血栓作用较强的新型类肝素药物,发现岩藻多糖具有上述特点,其药理活性及机制已经多方面的报道^[7-8]。FV是从海带等褐藻中提取出来的岩藻聚糖硫酸酯,经过化学降解、修饰而得到的阴离子物质。本文对其抗血栓活性进行了研究。

静脉血栓主要由于血流缓慢或瘀滞、凝血因子聚集而导致血液凝固,所有凝血酶的激活是主要因素之一。结扎大鼠下腔静脉使血流瘀滞,启动内源性凝血系统,促进静脉血栓的形成^[9]。本研究利用该模型模拟静脉血栓的形成,结果表明FV给药组可降低大鼠静脉血栓的湿质量和干质量,呈剂量相关性关系,说明FV具有抗静脉血栓形成,抑制凝血系统的作用。前期研究结果也表明FV对内、外源性激活复合物的激活具有显著的抑制作用,延长活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT),从而阻滞血液凝固,是其发挥抑栓作用的主要机制。

动静脉旁路血栓模型反映机体动脉血流中血小板黏附聚集功能,形成的血栓结构与动脉中的白色血栓类似,是研究药物溶栓抑栓较为成熟的方法^[10]。动脉血栓主要由于血小板聚集引起,血流速度和血液黏度为次要因素,血小板的黏附聚集功能与形成的血栓质量有直接影响。研究结果显示FV各剂量组均能显著降低大鼠动脉血栓的干湿质量,表明FV对血小板黏附聚集所形成的血栓具有一定的抑制作用。

Chandler体外血栓形成法是在旋转的圆环内模拟体内血液流动状态,令血液在下弯月面产生一个

复杂流动区,启动血小板聚集而形成头部具有动脉血栓特征而体尾部具有静脉血栓特征的混合血栓^[11]。研究结果显示FV各剂量组均能显著降低大鼠体外血栓的干湿质量,表明FV对混合血栓也有一定的抑制作用。

综上所述,低剂量的FV即具有抑制静脉血栓、动脉血栓及混合血栓形成的药理活性,且出血风险较小。拟将FV定位在预防与治疗膝关节或髋关节置换手术后深静脉血栓形成的药物,推荐FV的临床日用量为27 mg(成人以60 kg计,换算成大鼠剂量为2.5 mg/kg)。本研究首次对FV的抗血栓作用进行了研究,FV有望被开发成为一种抗血栓性疾病的海洋药物。

参考文献

- [1] Athukorala Y, Lee K W, Kim S K, *et al.* Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea [J]. *Bioresour Technol*, 2007, 98(9): 1711-1716.
- [2] Pacheco R G, Vicente C P, Zancan P, *et al.* Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2000, 11(6): 563-573.
- [3] Reyers I, Mussoni L, Donati M B, *et al.* Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats [J]. *Thromb Res*, 1980, 18(5): 699-674.
- [4] 王北婴, 李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 677-688.
- [5] Bara L, Bloch M F, Samama M M. A comparative study of recombinant hirudin and standard heparin in the Wessler model [J]. *Thromb Res*, 1992, 68(2): 167-174
- [6] Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, *et al.* *In vitro* and

- in vivo* studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor [J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(3): 514-521.
- [7] 刘颖, 张敏, 吴茜茜, 等. 岩藻多糖的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(6): 146-151.
- [8] 张秀坤, 李八方, 张朝辉, 等. 岩藻聚糖硫酸酯的生物活性及作用机理研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(27): 12924-12926.
- [9] 黎渊弘, 黎肇炎, 黄丙轮. 短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白对动物血栓的抗栓作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 34-36.
- [10] 许超千, 焦军东, 孙宏丽, 等. 蚓激酶对实验动物血栓及相关血液学指标的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1367-1369.
- [11] 马怡, 徐秋萍. 血栓形成的实验动物模型研究概况 [J]. 中药药理与临床, 1998, 14(2): 46-48