

• 论 著 •

长期使用邦亭所致的血浆纤维蛋白原降低机制的初步实验研究*

苑 林, 钟伟国, 邓勤勤, 徐 宁[△]

(广州中医药大学第二附属医院/广东省中医院芳村医院检验科, 广州 510370)

摘 要:目的 研究邦亭体外降低血浆纤维蛋白原(FIB)及对与 FIB 合成相关的细胞因子白介素-6(IL-6)表达水平的影响。方法 体外实验随机选取 50 份健康体检者混合血浆充分混匀后, 随机平均分为 7 组, 加入不同水平稀释的邦亭注射液后置于 37 ℃ 温箱孵育, 每 12 h 检测 FIB 水平; 动物实验选取 6 周龄健康昆明小鼠 80 只, 雌雄各半, 随机分为阴性对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组 20 只, 雌雄各半。各组按剂量腹腔注射邦亭 3 周后处死, 分别检测凝血因子 V、凝血因子 VIII、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、FIB 和 IL-6 水平。结果 邦亭在体外有很强的降低 FIB 的作用, 并呈现出明显的时间和剂量依赖性; 邦亭长时间小剂量使用, 可降低小鼠体内的 FIB 水平, 但对凝血因子 V、凝血因子 VIII、PT、凝血酶时间(TT)并无明显影响; 与阴性对照组相比, 低、中、高剂量组的 FIB、IL-6 水平均下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 各组间 FIB 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 中、高剂量组的 APTT 轻微延长, 与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 邦亭体内外均有较强的降低 FIB 的作用, 临床长期用药时应密切检测患者的 FIB 水平, 邦亭体内不仅直接分解 FIB, 可能还影响 FIB 合成相关的细胞因子水平, 其具体机制有待进一步的研究。

关键词: 邦亭; 纤维蛋白原; 白介素-6; 活化部分凝血活酶时间; 凝血酶原时间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)17-2401-03

Preliminary experimental study on hypofibrinogenemia in the long-term administration of hemocoagulase*

YUAN Lin, ZHONG Weiguo, DENG Qinqin, XU Ning[△]

(Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine/Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine Fangcun Division, Guangzhou, Guangdong 510370, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of the long-term administration of hemocoagulase in vitro and in vivo, whether it may cause hypofibrinogenemia and changes of cytokine interleukin-6 (IL-6) expression level which related to fibrinogen synthesis. **Methods** Totally 50 healthy subjects pooled plasma was chose in vitro experiments, which was divided into 7 groups. After that, added various of dilutions of injection hemocoagulase and incubated at 37 ℃, detected FIB concentration every 12 h. In vivo experiments, 80 rats with six-week old were randomly divided into 4 groups: negative control group, high-dose group, middle-dose group, low-dose group. After 3 weeks administration, the serum level of V factor, VIII factor, PT, activated partial thromboplastin time (APTT), FIB, IL-6 was detected. **Results** Hemocoagulase in vitro had a strong role to reduce fibrin, and showed a significant dose-dependent and time-dependent; Hemocoagulase prolonged low-dose use might reduce the concentration of FIB in mice, but the V factor, VIII factor, PT, APTT, TT were not significantly affected. Compared with the negative control group, FIB and IL-6 concentration decreased in high-dose group, middle-dose group, low-dose group and had statistically significant differences ($P < 0.05$); The level of FIB among the groups had statistically significant differences ($P < 0.05$). The APTT of the middle and high dose groups was slightly prolonged, which was significantly different from that of the negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Hemocoagulase has a strong effect to reduce the concentration of fibrin, when there is a long-term medication, fibrin concentration of the patient should be closely monitored, hemocoagulase not only directly decomposed fibrin, but also may affect the synthesis of IL-6, the specific mechanism needs further study.

Key words: hemocoagulase; fibrinogen; interleukin-6; activated partial thromboplastin time; prothrombin time

邦亭主要成分是从长白山白眉蝮蛇冻干蛇毒中提取分离得到的血凝酶, 主要用于需减少流血或止血的各种医疗情况, 如外科和妇产科等临床科室的出血及出血性疾病; 也可用来预防出血, 如手术前用药, 可避免或减少手术部位及手术后出血^[1-4], 其不良反应发生率较低, 偶见过敏样反应。研究者前期临床观察发现, 患者应用蛇毒血凝酶邦亭前血浆纤维蛋白原(FIB)水平均正常, 连续用药 12~20 d 后降至 0.5 g/L 以下, 停药并输注新鲜血浆或 FIB 制剂后血浆 FIB 水平恢复正常、出

血停止^[5-6]。本研究邦亭降低 FIB 的机制, 旨在引起临床医生重视, 进一步认识邦亭参与凝血反应的机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 SysmexCS 2000i 全自动凝血分析仪及其配套试剂; 小鼠白介素-6(IL-6)的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒由美国 RayBiotech 公司提供, 批号: 201404, 效期: 201501。

1.2 药品与体外实验混合血浆 注射用白眉蛇毒血凝酶, 商

* 基金项目: 广东省中医院综合标准化试点重点示范项目资助(YN2015BZ10)。

作者简介: 苑林, 女, 主管技师, 主要从事临床凝血检验工作研究。 [△] 通信作者, E-mail: xu_ning21@163.com。

品名为邦亭,锦州奥鸿药业有限责任公司市售产品,国药准字 H20041730,批号:201501,效期:201701,其有效成分为蛇毒血凝酶和磷脂依赖性凝血因子 X 激活物(FXA),规格为每支 1 U;随机选取 50 份健康体检者混合血浆充分混匀后,随机平均分为阴性对照组和 6 个实验组。

1.3 实验动物分组 6 周龄健康昆明小鼠 80 只,雌雄各半,体质量 20~40 g,平均(30±10)g,由中山大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXY(粤)2011-0029,于中山大学实验动物中心无特定病原体动物(SPF)级环境适应性饲养 1 周,期间自由进食水,光控周期 12 h。按随机数字表法将小鼠分为阴性对照组及低剂量、中剂量、高剂量组。本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 方法

1.4.1 分组及给药 80 只小鼠随机分为 4 组,每组 20 只,雌雄各半,分为阴性对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,用药组分别按照临床等效剂量(0.26 U/kg)、2 倍临床等效剂量、4 倍临床等效剂量给药;阴性对照组给予 100 μL 的生理盐水。以上各组每天给药 2 次,早晚各 1 次,尾静脉注射,因临床病例多为给药 2~3 周后出现低纤维蛋白原血症,故给药时间选定为 3 周,于末次给药 2 h 后分别经尾静脉和眼球取血适量用于凝血功能检测及 IL-6 检测。

1.4.2 检测指标 小鼠先经尾静脉取血 0.45 mL,置于预先准备的 0.05 mL 枸橼酸钠抗凝(抗凝比例为 1:9)的离心管内,3 000 r/min 离心 10 min,取上层血浆测定活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、FIB、凝血时间(TT)及凝血因子 V、凝血因子Ⅷ等;然后经眼球取无抗凝血 0.5 mL,室温凝固 30 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,取上层血清测定 IL-6,所有测定严格按照试剂盒使用说明操作进行。

表 1 邦亭小鼠体内凝血功能检测指标($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	PT(s)	APTT(s)	FIB(g/L)	TT(s)	凝血因子 V (%)	凝血因子Ⅷ (%)	IL-6(ng/L)
阴性对照组	20	8.75±0.9	24.7±1.4	3.74±0.43	10.10±1.28	110.0±8.8	120.0±13.9	110.7±8.7
低剂量组	20	9.10±0.9	25.9±1.2	2.74±0.38*△▲	10.40±1.42	102.0±7.9	112.0±14.9	102.1±7.9*
中剂量组	20	9.52±0.9	26.6±2.1*	2.05±0.14*#▲	10.40±1.18	99.0±11.6	111.0±11.8	99.3±11.6*
高剂量组	20	9.45±1.1	27.4±3.1*	1.14±0.31*#△	9.80±0.95	97.0±6.7	110.0±12.1	97.5±6.9*

注:与阴性对照组比较,**P*<0.05;与低剂量组比较,#*P*<0.05;与中剂量组比较,△*P*<0.05;与高剂量组比较,▲*P*<0.05。

3 讨 论

止血药种类繁多,作用机制各不相同。蛇毒中含有多种促凝成分^[7-8],目前开发的蛇毒类血凝酶属于丝氨酸蛋白酶,可促进 FIB 的凝固。邦亭的有效成分为蛇毒血凝酶和磷脂依赖性凝血因子 X 激活物(FXA),是一种靶向性生物止血剂,只在出血部位激发血栓形成,不引起正常血管内凝血和血栓形成,蛇毒血凝酶直接作用于凝血过程的第Ⅲ阶段,加速血液凝固;FXA 作用于凝血第一阶段,促进因子 X 转变为 Xa,促进出血部位的血小板发生不可逆的聚集和释放反应,产生白色栓子,产生凝血效应,加速血液凝固和促进出血血管上皮细胞生长,使伤口愈合。作为一种速效、高效、使用安全方便的酶性止血药,邦亭静脉注射后 5~10 min 起效,20~30 min 达到峰值,峰值持续 2 h,24 h 后止血作用消失,比一般止血药具有更好的止血效能,直接作用于内外源性凝血系统,具有凝血和止血作用,为高效、速效止血药。

邦亭中含有类血凝酶和类凝血激酶,两种类酶为相似的酶作用物,在 Ca²⁺存在下,能活化凝血因子 V、Ⅶ和Ⅷ,并刺激血

1.5 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计学软件进行数据处理。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 体外实验 邦亭体外有很强的促凝作用。取 50 mL 正常标本的混合血浆,平均分为 7 组,每组 2 支管,每管 3 mL,取其中 2 支管作为对照,加入 10 μL 注射用水作为阴性对照组,实验组分为 6 组,加入 10 μL 倍比稀释后的邦亭注射制剂,各组稀释度分别为 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32,共 6 组,37 ℃温箱孵育,每隔 12 h,取出检测各管的 FIB 水平,结果取 2 管平均值,结果表明,邦亭在体外小剂量使用,即有很强的促凝作用,实验过程中可观测到各管可形成明显的 FIB 凝块,各实验组的 FIB 水平下降程度与放置时间和邦亭的水平有显著的依赖关系,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 动物实验 邦亭体内有降低 FIB 的作用,邦亭高、中、低剂量组 FIB 和 IL-6 水平与阴性对照组比较,差异有统计学意义(*P*<0.05);邦亭高、中、低剂量组间 FIB 水平比较差异有统计学意义(*P*<0.05);但邦亭高、中、低剂量组间 IL-6 水平比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),除此之外还发现中、高剂量组的 APTT 轻微延长,与阴性对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。结果表明,长时间小剂量给小鼠注射邦亭,可明显降低小鼠体内的 FIB、IL-6 水平,且 FIB 降低具有明显的剂量依赖性,中、高剂量给小鼠注射邦亭后可使其 APTT 轻微延长,但对凝血因子 V、凝血因子Ⅷ、PT、TT 并无明显影响,见表 1。

小板的凝集;类凝血激酶在血小板因子Ⅲ存在下,可促使血凝酶原变成血凝酶,也可活化凝血因子 V,并影响凝血因子 X。根据文献[9-10]报道,常见的蛇毒血凝酶,如速乐涓术前或术后预防用药均易引起伤口渗血或出血及 FIB 降低,邦亭在大剂量时则具有较强的去 FIB 作用,能明显降低血液中 FIB,而使血液黏度及凝血性下降,但小剂量长期应用是否有去 FIB 作用则仅见王兆钺等^[11]报道 1 次,还需要更多的临床病例观察。

因此,本实验分别通过体外实验和动物实验初步模拟邦亭的药物作用,便于更好地认识和使用该药物,体外实验结果显示,邦亭体外具有很强的降低 FIB 水平作用,有明显的时间和剂量依赖性,动物试验结果显示,其小剂量长期使用时,可以明显降低小鼠体内的 FIB 水平,研究者猜测这是由于蝮亚科蛇毒中含有具有促凝血活性的丝氨酸蛋白酶,能直接作用于 FIB 促进血液凝固,而蛇毒血凝酶能水解 FIB Aα 链,只形成纤维蛋白单体,纤维蛋白单体只能形成不稳定的 FIB,达到暂时的止血效果^[12],但是正常形成的血凝酶在凝血过程中不仅水解 FIB Aα 链,而且同时水解 FIB Bβ 链,使 FIB 转化为纤维蛋白单体,

并释放 FIB 肽 A 和 B,这些纤维蛋白单体可能和各种 FIB 及各种 FIB 降解产物结合后相互联接,同时激活凝血因子Ⅻ,使之绞连为稳定的 FIB 凝块^[13-15]。由于蛇毒血凝酶仅水解 FIBA α 链,形成的纤维蛋白单体无法相互绞联,被网状内皮系统所清除从而降低 FIB 水平,这反而会引起抗凝作用,产生出血,该药物持续消耗 FIB,导致血浆 FIB 水平降低,同时,在此过程中活化凝血因子 V、Ⅶ、Ⅷ和Ⅹ,因此出现小鼠体内凝血因子 V 和凝血因子Ⅷ的轻度消耗,但凝血因子Ⅶ和Ⅹ由于未能购买到试剂,未能检测,同时推测其凝血因子的消耗,导致了 APTT 的轻度延长。另外,研究者同时检测了促进 FIB 合成功能的细胞因子 IL-6,结果发现实验组小鼠体内的 IL-6 水平并没有如预期中反馈性升高,反而出现了不同程度的下降,原因还需要进一步实验研究。

参考文献

- [1] 郑放明,唐万彪,龙从凤,等.白眉蛇毒血凝酶在子宫肌瘤切除术中的应用[J].现代医药卫生,2013,29(18):2807-2808
- [2] 何俊鹏.邦亭与洛赛克联用治疗上消化道出血的临床效果分析[J].中国实用医药,2017,12(13):112-113.
- [3] Xu YY, Ma XH, Zhang SJ. Hemocoagulase agkistrodon-induced anaphylactic shock: A case report and literature review[J]. Clin Pharmacol Ther, 2016,54(2):129-134.
- [4] Xu YY, Li BL, Jin YL, et al. Serious anaphylactic shock induced by hemocoagulase agkistrodon during anesthesia in a 5-year-old child[J]. Clin Exp Med, 2015,8(3):4727-4730.
- [5] 赵阳,杨东辉,马晓霞.苏灵注射液与邦亭注射液对结直肠癌术后止血疗效的比较[J].实用药物与临床,2015,18(5):617-619.
- [6] Shenoy KV, Baliga M, Mahajan S, et al. The effects of

topical hemocoagulase solution on the healing process of post-extraction wounds: A split mouth design[J]. Maxillofac Oral Surg, 2015,14(3):586-593.

- [7] 吕骅,朱明炜,崔红元,等.白眉蛇毒血凝酶对老年腹腔镜胆囊切除患者的止血作用 and 安全性探讨[J].中华老年医学杂志,2013,32(4):393.
- [8] 黄晓梅,高红瑾.蛇毒血凝酶致低纤维蛋白原血症浅析[J].海峡药学,2016,28(6):267-269.
- [9] 李巍,颜彪华,张瑛,等.注射用蛇毒血凝酶致纤维蛋白溶解症 1 例[J].中国当代医药,2013,20(14):155-156.
- [10] 孟景晔,骆子义,朱惠敏,等.蛇毒血凝酶引起低纤维蛋白原血症 6 例[J].中国输血杂志,2014,27(4):446-447.
- [11] 王兆钺,李建琴,曹丽娟,等.长期使用蛇毒血凝酶致低纤维蛋白原血症三例报告并文献复习[J].中华血液学杂志,2014,35(1):50-52.
- [12] 白亮.经胃镜局部喷洒邦亭治疗急性上消化道出血的分析[J].中国医药指南,2016,14(36):37-38.
- [13] 周兵,冯强.比较邦亭与止血芳酸在急性结石性胆囊炎围手术期的止血效果[J].求医问药 2013,11(1):179.
- [14] 孟景晔,骆子义,朱惠敏,等.蛇毒血凝酶引起低纤维蛋白原血症 6 例[J].中国输血杂志,2014,27(4):446-447.
- [15] Joshi SA, Gadre KS, Halli R, et al. Topical use of Hemocoagulase (Reptilase): A simple and effective way of managing post-extraction bleeding[J]. Ann Maxillofac Surg 2014,4(1):119.

(收稿日期:2017-05-04 修回日期:2017-07-03)



(上接第 2400 页)

参考文献

- [1] 袁淮涛,管健,张文,等.珠三角地区基层医院 1 898 例颅脑损伤患者的流行病学调查研究[J].中国中西医结合急救杂志,2014,20(4):303-306.
- [2] 赵飞,何先弟,汪华学,等.老年颅脑损伤患者血清脑钠肽、D-二聚体和 C 反应蛋白变化及临床意义[J].中国老年学杂志,2015,22(8):2109-2110.
- [3] 王强,刘红丹,汪兵.重型颅脑损伤患者急性期反应蛋白与能量平衡的关系[J].微循环学杂志,2013,23(1):33-35.
- [4] 毛成远.重型颅脑损伤继发外伤性癫痫 100 例临床研究[J].医学信息,2014,22(5):325-326.
- [5] 包改辉,许健健.住院开放性颅脑损伤患者的患病状况调查及预后因素[J].中国老年学杂志,2016,36(7):1665-1666.
- [6] 范文超,方健,秦峰,等.661 例颅脑损伤患者伤情特点和结局危险因素分析[J].中华创伤杂志,2012,28(7):584-587.
- [7] 张杏婷.创伤评估法在急诊分诊中的应用分析[J].大家健康,2015,30(4):287-288.

- [8] 葛文汉,李兵,阮海林,等. CRAMS 评分评估急性创伤患者预后的价值[J].中华创伤杂志,2014,30(8):807-810.
- [9] 李海勇,王海燕,刘丽静,等.重症创伤患者血浆白蛋白、前白蛋白水平与 C 反应蛋白水平变化相关性[J].医疗装备,2015,20(14):9.
- [10] 陈怡发.降钙素原、C 反应蛋白及前白蛋白在评估创伤性休克病情中的价值[J].实用临床医药杂志,2014,18(11):180-181.
- [11] 信朝霞,黄燕.恶性肿瘤患者急性时相反应蛋白测定及意义[J].河北北方学院学报(医学版),2009,26(4):51-53.
- [12] 徐旭,肖君,刘耘,等.血清前白蛋白与白蛋白测定结果比较分析及临床应用探讨[J].临床和实验医学杂志,2002,1(4):234-236.
- [13] 张丽.自我效能护理干预在轻中型颅脑损伤病人康复期的应用效果观察[J].护理研究,2015,32(5):633-635.
- [14] 田琨.老年性颅脑损伤患者生活质量及其影响因素[J].中国老年学杂志,2011,31(9):1629-1630.
- [15] 于洋,张琳瑛,梁恩和.中文版创伤性颅脑损伤患者生活质量量表的信度及效度研究[J].中华物理医学与康复杂志,2013,35(5):356-359.

(收稿日期:2017-02-06 修回日期:2017-04-06)