

渐减退,这一过程在 35 岁后开始加速⁽⁸⁾。本研究中,我们发现随着年龄的增加,卵巢反应低下,两种促排方案在各年龄组的临床妊娠结局并无显著差异,但短方案促排 Gn 用量及刺激天数均明显大于微刺激促排,表明年龄不影响卵巢低反应患者对微刺激促排方案的选择。

综上所述,LE 微刺激超促排的临床效果同短方案相似,但 Gn 刺激天数和 Gn 用量大大减少,是一种经济、有效的超促排方案,同时年龄因素不影响卵巢低反应患者对微刺激促排的选择。

参考文献

- (1) 中华医学会编著. 临床诊疗指南(M). 北京:人民卫生出版社.
- (2) Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibition reduces the dose of gonadotropin required for controlled ovarian hyperstimulation (J). J Soc Gynecol Investig 2004, 11(6): 406-415.
- (3) XIA Huan, SUN Li-Jun, WANG Xing-Ling et al. Application of mini-

stimulation protocol of letrozole in the patients with ovarian poor response (J). Maternal and Child Health Care of China 2011, 30(3): 4725-4728.

- (4) Andrea Weghofer, Markus Margreiter, Sami Bassim, et al. Minimal stimulation using recombinant follicle-stimulating hormone and a gonadotropin-releasing hormone antagonist in women of advanced age (J). Fertility And Sterility 2004, 81(4): 1002-1005.
- (5) 匡延平. 微刺激促排方案的临床研究 (J). 生殖医学杂志, 2010, 19(4): 356-359.
- (6) 胡玥玥, 叶云, 黄晓卉, 等. 来曲唑微刺激促排卵新鲜周期与冷冻周期胚胎移植结局的比较 (J). 西部医学 2010, 22: 1598-1600.
- (7) 焦泽旭, 庄广伦, 周灿权, 等. 高龄妇女接受体外受精-胚胎移植的结局 (J). 中华妇产科杂志 2002, 37(4): 223-226.
- (8) Muasher SJ. Controversies in assisted reproduction: treatment of low responders (J). J Assisted Reprod Genet, 1993, 10(1): 112-114.

水蛭素及重组水蛭素的研究概况

郑巧燕(厦门大学附属第一医院杏林分院药学部 厦门 361022)

摘要: 目的 综述水蛭素、重组水蛭素的药理作用与临床应用研究进展,为其临床应用提供参考。方法 依据近年采国内外文献,进行分析、归纳和总结。结果与结论 水蛭素、重组水蛭素是迄今发现的活性最强的特异性凝血酶抑制剂,通过与凝血酶特异性结合而产生强有力地抑制血液凝固的作用,在心、脑血管系统疾病等方面的抗凝、抗血栓的应用广泛,药物开发前景广阔。

关键词: 水蛭素;重组水蛭素;结构特点;药理作用;临床应用

中图分类号: R969.4 文献标识码: B 文章编号: 1006-3765(2013) 08-0108-03

水蛭是我国传统中药中常用的活血、化瘀药,始载于《神农本草经》,历代本草均有记载。水蛭素是水蛭中的重要活性成分。1954 年,Markward 从水蛭头部唾液腺中分离出水蛭素纯品,开始对其组成结构和理化性质进行研究。它是一种目前已知的高效、特异的、最强的凝血酶抑制剂⁽¹⁾,但由于其来源匮乏,使水蛭素的研究与临床应用受到了限制,故国内外医药界均着重研究通过基因工程获得重组水蛭素。1986 年,水蛭素的 eDNA 被克隆出来之后,重组水蛭素的研究取得了很大的进步,获得了建立在多种载体上的重组水蛭素,包括在大肠杆菌、枯草杆菌、酵母菌及真核细胞等的成功表达⁽²⁾。国外已有几个实验室成功地应用基因工程方法获得相当量的结构与药理活性与天然水蛭素基本相同的重组水(Recombinant hirudin rH)⁽³⁾,从而推动了水蛭素的药理、临床等方面研究工作的深入开展。

1 结构特点及作用机制

天然水蛭素从医用水蛭唾液腺分泌物中提取,是一条含 65 或 66 个氨基酸残基组成的单链多肽,分子质量为 7Ku,其 N 末端有 3 对二硫键(Cys-Cys14, Cys16-Cys28, Cys32-Cys39),使肽链折叠成密集形核心环肽结构,这是水蛭素的核心区域,对蛋白结构起稳定作用。其 N 末端含活性中心,能识别底物-凝血酶碱性氨基酸富集位点,并与其结合。C 末端富含酸性

氨基酸残基,可阻断凝血酶与纤维蛋白原的识别位点,产生抗凝作用。最后天然水蛭素第六十三位的酪氨酸残基被硫酸化,而重组水蛭素没有这个特殊的结构,因此后者抗凝比活性有所下降。肽链中部还有一个由 Pro-Lys-Pro 组成的特殊序列,不被一般蛋白酶降解,这一结构在维持水蛭素分子的稳定性和引导水蛭素分子以正确方向与凝血酶分子结合方面发挥着重要作用^(4,5)。

凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶,在血栓形成过程中起非常关键的作用,包括血凝过程中的级联反应、纤维蛋白沉积和血小板活化等。凝血酶有 4 个结合位点:纤维蛋白结合位点、非活性底物识别位点、酶活性中心和肝素结合位点。水蛭素作用于其中非活性底物识别位点和酶活性中心两个位点,它们以 1:1 的方式形成紧密的非共价结合的可逆复合物(结合常数为 230fmol·L⁻¹)而发挥抗凝作用。水蛭素与凝血酶特异性结合是一个二相的过程,首先是 C 末端的酸性氨基酸与凝血酶的碱性部位结合,封闭凝血酶的底物识别位点;其次是这种结合使凝血酶构型发生轻微改变,促进水蛭素 N 末端与凝血酶的活性中心结合,从而抑制凝血酶的催化活性。天然水蛭素、重组水蛭素及其类似物都有这两个结合位点⁽⁵⁾。

水蛭素高效、特异地与凝血酶结合,从而使之失去裂解纤维蛋白原为纤维蛋白的能力,进而阻止纤维蛋白的凝固,同时

阻止凝血酶催化的止血反应及凝血酶诱导的血小板反应,最终达到抗凝的目的⁽⁶⁾。

2 药理作用

2.1 抗凝作用 无论是内源性或外源性凝血系统,其最后共用途是凝血酶被激活,激活的凝血酶使凝血因子 I 转变为纤维蛋白单体,从而使血液凝固和血栓形成得以完成。水蛭素或重组水蛭素可抑制凝血酶的促凝作用,使凝血过程减慢,且其作用不需抗凝血酶 III 和其它辅因子协助。水蛭素除了与血浆中游离的凝血酶结合外,也能中和与纤维蛋白结合的凝血酶。水蛭素的作用机制是抑制凝血酶上凝血因子 I 的结合位点,使凝血因子 I 不能和凝血酶结合,从而直接抑制了凝血过程⁽⁷⁾。

2.2 抗血小板作用 水蛭素可降低血小板表面活性,抑制血小板聚集,降低血小板黏附性。血管内皮细胞损伤和功能衰退引发血小板的激活,血小板通过其糖蛋白上的 IB 和 I a/II a 受体与胶原组织结合,形成血小板粘附,凝血酶是作用最强的促进血小板激活的物质,水蛭素与之结合可抑制凝血酶与血小板的结合及血小板受凝血酶刺激后的释放,使两者分离,从而减弱凝血酶激活血小板的作用,抑制血小板聚集⁽⁸⁾。

3 临床应用

3.1 治疗弥散性血管内凝血(DIC) DIC 是毛细血管内发生血小板聚集和纤维蛋白沉积,产生微循环障碍,主要是脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)等引发。rH 能抑制微血栓的形成从而可治疗 DIC。24 例男性健康志愿者静脉注射脂多糖(LPS) $2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,诱发 DIC,随后分为实验组与对照组进行,治疗结果显示,对照组 TAT(凝血酶-抗凝血酶 III 复合物)和 D-D 二聚体明显高于实验组,提示水蛭素有治疗 DIC 之功效⁽⁹⁾。

3.2 治疗心脑血管疾病

3.2.1 治疗急性心肌梗死(AMI): 动脉粥样斑块破裂导致血栓形成,是引起 AMI 等多种急性冠脉综合征的直接发病原因,同时 AMI 病人在溶栓治疗过程中,又有血栓形成,会严重降低溶栓治疗的效果。因此,溶栓药物(rt-PA, SK)与抗血小板活性药物(Aspirin)和抑制凝血酶活性的药物(heparin, hirudin)联合用药,可以提高治疗效果。与肝素相比,水蛭素抗凝作用有独特的优越性,水蛭素与 rt-PA 联合用药,改善溶栓治疗效果的临床 II 期试验,确定和优化了水蛭素所需的剂量,并对其安全性作了评价⁽¹⁰⁾。

3.2.2 治疗不稳定型心绞痛: 水蛭素还抑制凝血酶同血小板结合,抑制血小板的聚集和释放,并活化纤维蛋白原前活化因子,分解纤维蛋白原,从而有效抑制微血栓形成,防止或减少不稳定型心绞痛(UA)的发生⁽¹¹⁾。

3.2.3 治疗脑血栓和脑出血: JIzef S Mruk 等研究表明,肝素、水蛭素、阿司匹林等都能加速富含血小板的血栓溶解,但只有水蛭素能很好地清除血管壁残余的血栓。据孙伯等报道,用水蛭素治疗脑出血颅内血肿 48 例,病愈 16 例,显效 20 例,好转 8 例,死亡 4 例,有效率 91.7%。毛俊雄应用水蛭素治疗脑出血病 29 例,总有效率为 90%,CT 证实其促进了血肿的吸收,使偏瘫、意识、语言得到恢复,且无副作用⁽¹²⁾。

3.2.4 减轻脑出血水肿: 最新研究表明,凝血酶直接参与脑

出血后脑水肿的发病机制,早期脑水肿可能是由于凝血酶激活酶原通过细胞毒性受体调节的直接细胞毒性作用,后期则是由于血脑屏障破坏形成的脑水肿⁽¹³⁾。姜亚军⁽¹⁴⁾等研究发现,水蛭素明显抑制脑出血周围组织内凝血酶受体(PAR-1)表达,同时使脑组织水肿和神经凋亡显著减轻。

3.3 预防深静脉血栓 深静脉血栓(Deep venous thrombosis, DVT)是外科手术最严重和最常见并发症,可导致肺栓塞和血栓后综合征。最新的报道认为,髋关节和膝关节置换手术后,使用肝素或低分子肝素抗凝,深静脉血栓的发病率仍为 20%~45%。目前,用水蛭素预防深静脉血栓的临床 II 期试验获得了初步的结果。选择了 10 位髋关节置换术的患者,每 12h 皮下注射水蛭素 $0.1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 10d,首次剂量在手术后 3h 给药。双下肢静脉造影和通气后的肺部扫描显示,深静脉血栓、肺栓塞和出血都未出现⁽¹⁰⁾。

3.4 预防溶栓或血管再造后血栓形成 经皮腔内冠状动脉成形术(PICA)和冠脉内支架术(IVS)已成为冠心病内科的主要治疗措施之一。IVS 的应用显著降低了冠脉再狭窄(RS)的发生率,但 IVS 后仍有一定的 RS 率(10%~15%)⁽¹⁵⁾,这严重影响了 PTCA 及 IVS 的治愈率。Markward⁽¹⁶⁾报道 PTCA 支架后应用重组水蛭素抗凝疗效优于肝素⁽⁶⁾。

3.5 治疗肝素相关性血小板减少症(HAT) HAT 是肝素治疗中的较为严重的不良反应,有 HAT I 和 HAT II 两种类型,发生机制不同。HAT I 型轻微,一般无须治疗,可自行恢复;HAT II 型则较严重,易并发动、静脉血栓。部分病人使用肝素 5d 后发生 HAT II。一旦怀疑有 HAT II,肝素治疗必须停止。但是在通常情况下,对于这些患者,抗凝治疗是无法停止的。水蛭素与肝素的分子结构完全不同,作用机制也不一样,两者之间不存在交叉反应,水蛭素代替肝素进行抗凝治疗,可有效地恢复血小板浓度,减少血栓复形成⁽⁹⁾。

3.6 用于血液透析过程中的抗凝 血液透析(Hemodialysis)过程中,大面积的体外人工系统极易激活凝血系统,因此,有效的抗凝、防栓是必要的。研究发现,利用肝素抗凝存在较多的副作用。Vanholder 等开展了随机 II 期临床试验,对 20 例慢性肾衰患者在血透过程中使用重组水蛭素作抗凝治疗,剂量梯度为 0.02、0.04、0.06 和 $0.08\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,直接注入透析的动脉回路中。仅在低剂量组中发现有 1 例患者出现凝血现象,各组均未见出血。试验结果表明,在血液透析过程中, $0.08\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 水蛭素抗凝(动脉回路直接给药)安全、有效⁽¹⁷⁾。

3.7 眼科临床的应用 郑燕林⁽¹⁸⁾等制造穿孔性眼外伤的动物模型,将水蛭素 0.1mL(10 单位)注入兔玻璃体内,对照组注入 0.1mL 生理盐水,用放射免疫法测定玻璃体内层粘连蛋白和 IV 型胶原的含量,结果表明,外伤后 1 周水蛭素组比对照组含量明显下降,水蛭素对外伤性增生性玻璃体视网膜病变有一定的抑制作用。重组水蛭素对实验性眼内增生性病变(PVR)具有抑制作用,其通过抑制凝血酶诱导的血小板反应及色素上皮细胞、神经胶质细胞及成纤维细胞的增殖,阻止了增殖膜的形成,能够防治眼内增生性病变的形成⁽¹²⁾。

3.8 在肿瘤方面的研究 已知凝血功能改变可改变肿瘤细

胞的表型和活性,从而使肿瘤细胞在局部增殖、浸润甚至向其他部位转移。重组水蛭素通过其抗凝作用,抑制纤维蛋白的形成,能防止肿瘤细胞与血纤维蛋白或血小板凝集,使 NK 细胞或其他细胞毒效应细胞的活性得以发挥。另外,血小板与恶性肿瘤的侵袭和转移密切相关。血小板表达的粘附蛋白和肿瘤细胞表面表达的血小板免疫相关抗原起着重要作用。张培彤等^[19]的研究结果提示重组水蛭素和凝血酶对人肺巨细胞癌 PGCL3 细胞表面血小板免疫相关抗原 CD9、CD42a、CD63、TSP 的不同影响可能与它们对 PGCL3 细胞粘附和侵袭的不同作用有关^[6]。

3.9 其他 水蛭素及重组水蛭素还可以用于治疗纤维沉淀性关节炎,水蛭素能有效地减少滑液增生、关节纤维蛋白沉积,对关节炎既有预防又有治疗效果^[12]。此外,可降低蛋白尿,改善肾功能,降低血脂,具有抗凝抗血栓形成、改变血液流变性、抗炎、抗增殖和抗纤维化等多种药理活性^[9]。

4 不良反应及防治

水蛭素存在的主要问题是出血并发症,所以要控制剂量,及时监测,严格选择适应症,可使水蛭素的出血发生率减少到很低的程度。因水蛭素半衰期较短可以通过血清融合蛋白、PEG 融合蛋白等有效地解决。重组水蛭素只有在使用高于 20 倍有效抗栓剂量时才引起轻度出血,为避免发生止血失调,研究了重组水蛭素的中和作用。7-凝血酶、凝血酶-a、&-巨球蛋白等能中和重组水蛭素而不影响其抗凝作用。激活的凝血酶原复合物浓缩物(PCC)可生成比正常水平高的凝血酶,故可拮抗重组水蛭素。重组 VIIa 因子亦可逆转重组水蛭素出血的不良反应^[12]。

5 结语

水蛭素是一种高效、直接、特异的凝血酶抑制剂,具有很强的抗凝、抗血栓以及抗炎等多种药理活性。与肝素等传统的抗凝药物相比,其治疗剂量小、疗效高、不会引起过敏反应。水蛭素有抗原性,但其抗体没有害,反而延长消除半衰期,是一种少见的正效果抗体。因此水蛭素的应用将会不断得到开拓和推广,重组水蛭素将会成为新一代的抗凝、抗栓新药。

参考文献

- (1) Markwardt F. The development of hirudin as antithrombotic drug (J). *Thromb Res* 1994 74: 1-23.
- (2) 郑琳,郭长虹,马军,张爽,徐国辉. 重组水蛭素研究进展(J). 中

- 医药学报 2007 04: 59-60.
- (3) Markwardt F. Hirudin and derivatives as anticoagulant agents (J). *Thromb Hemost* 1991 66(1): 141-152.
- (4) 李超,张相年,石磊. 水蛭素及其临床应用(J). *实用医学杂志*, 2007 21: 3458-3459.
- (5) 张士斌. 水蛭素的基础研究现状及临床应用展望(J). *北京医学*, 2006 03: 173-174, 177.
- (6) 吕莉,宋慧君,韩国柱. 重组水蛭素药理学研究进展(J). *血栓与止血学* 2003 01: 31-34.
- (7) 郭旭玲,王颖. 水蛭素的药理与临床应用研究进展(J). *中国海洋药物* 2004 04: 50-53.
- (8) 代全国,尹明浩. 水蛭素治疗脑血管疾病研究进展(J). *延边大学医学学报* 2007 03: 215-217.
- (9) 赵恒利,崔晞,郭瑞臣. 水蛭素基础及临床研究发展状况(J). *中国药理学杂志* 2006 05: 321-324.
- (10) 张国龙. 水蛭素的研究及临床应用进展(J). *江苏药学与临床研究* 2003 06: 15-18.
- (11) 王晓冰,高天宇. 疏血通注射液治疗不稳定型心绞痛的临床观察(J).
- (12) 潘贺,刚宏林,王志国. 水蛭素及重组水蛭素的应用研究概况(J). *中医药学报* 2006 02: 60-62.
- (13) 吴文斌,胡常林. 脑出血病理生理机制的研究进展(J). *国外医学·脑血管疾病分册*, 1998 7(3): 151-153.
- (14) 姜亚军,常诚,张琳,等. 脑出血后脑组织内凝血酶受体-1(PAR-1)的表达及其病理意义(J). *中风与神经疾病杂志*, 2004, 21(2): 100-103.
- (15) Cecena FA. Stenting stent: alternative strategy for treating in-stent restenosis (J). *Cathet Cardiovasc Diagn*, 1996 39(4): 377-382.
- (16) Markwardt F. Development of hirudin as an antithrombotic agent (J). *Semin Thromb Hemost* 1989 15: 269-282.
- (17) 莫炜,宋后燕. 重组水蛭素临床应用的研究进展(J). *国外医学(药学分册)* 2004 02: 82-86.
- (18) 郑燕林,蒋纪恺,王万杰,等. 水蛭素对外伤性增生性玻璃体视网膜病变细胞外基质的影响(J). *中国中医眼科杂志*, 2001, 11(1): 5-6.
- (19) 张培彤,裴迎霞,祁鑫,等. 不同药物对人肺巨细胞癌 PGCL3 细胞表面表达的血小板免疫相关抗原的影响(J). *中草药*, 1999, 30(5): 352-354.

大剂量羟考酮控释片治疗重度癌痛的安全性及疗效的临床分析

肖咨生,黄传钱,林益匡,连碧霞(福建医科大学教学医院宁德市医院放化疗科 宁德 352100)

摘要:目的 评价大剂量(≥ 1 日 150mg)奥施康定(羟考酮控释片)治疗晚期癌症重度疼痛的安全性和临床疗效。方法 选择 2008 年 12 月~2011 年 12 月就诊于我科的 21 例重度疼痛晚期癌症患者为研究组,25 例轻、中度疼痛晚期癌症患者为对照组。研究组给予大剂量奥施康定(1 日 150mg~640mg)治疗,对照组采用一般剂量奥施康定(1 日 10mg~140mg)治疗,比较两组疼痛缓解率和不良反应情况。**结果** 研究组和对照组总疼痛缓解率分别为 95.3%和 96.0%,两组间比较差异不具有统计学意义。研究组不良反应主要表现为便秘占 42.8%,其次是纳差、厌食、腹胀占 33.3%,恶心及呕吐、嗜睡、头晕、排尿困难等分别占 14.3%、14.3%、9.5%和 9.5%,对照组便秘占 32.0%,纳差、厌食、腹胀占 16.0%,恶心呕吐、嗜睡、头晕、排尿困难等分别占 12.0%、8.0%、4.0%和 4.0%,两组间差异不具有统计学意义。**结论** 大剂量奥施康定治疗重度癌痛的