中国科学: 生命科学 2011 年 第 41 卷 第 10 期: 1024 ~ 1029
SCIENTIA SINICA Vitae www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

论 文

国产人尿激酶原的药效学、药理学和毒理学研究

张正光[①], 肖成祖[①], 胡显文[①], 胥照平[①], 刘建勋[②], 杨素娟[③], 任建平[③], 廖明阳[④], 石笑春[④], 邬伯安[⑤]

① 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071;
② 中国中医研究院西苑医院, 北京 100091;
③ 军事医学科学院放射与辐射研究所, 北京 100850;
④ 军事医学科学院药物毒物研究所, 北京 100850;
⑤ 军事医学科学院微生物流行病研究所, 北京 100071
E-mail: zhangzhengguang1939@126.com

收稿日期: 2011-07-21; 接受日期: 2011-08-19
国家自然科学基金(批准号: 30671538)资助项目
doi: 10.1360/052011-593

摘要 通过对重组人尿激酶原(rhRhpro-UK)不同剂量(8 万 IU/kg 和 16 万 IU/kg)对家兔纤溶功能的影响并与尿激酶(UK)(8 万 IU/kg)比较实验显示, rhpro-UK 和 UK 都能明显缩短兔优球蛋白溶解时间, rhpro-UK 对纤溶参数影响比 UK 小. rhpro-UK 对体外血栓的溶解作用随剂量增加而增加, 与同剂量 UK 比较有显著差别. rhpro-UK 和 UK 对猪冠脉血栓都有明显的溶栓作用, 对猪的纤溶指标纤维蛋白原(FG)、纤溶酶原(PLG)和α_2抗纤溶酶(α_2-AP)无明显影响. rhpro-UK 对出血时间、凝血时间、单位时间内出血量均明显低于 UK. 表明 rhpro-UK 的副作用明显低于 UK. rhpro-UK 对小鼠、大鼠、犬和豚鼠回肠的一般药理学实验表明, rhpro-UK 对受试动物的一般行为、状态及中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统、消化系统等均无明显影响. 仅发现犬实验中手术创面有渗血现象, 对全身血液有类似肝素化状态. rhpro-UK 的毒理实验表明, rhpro-UK 的半数致死量为 97.5 mg/kg; Beagle 犬接受 2, 8, 28 mg/kg rhpro-UK 后, 除 8 mg 和 28 mg 组有一过性牙龈充血, 凝血时间明显延长, Tchol, TP 和 Alb 含量有升高趋势外, 未观察到明显毒性反应, 病理学检查也未观察到药物造成直接的脏器损伤, 2 mg/kg 组未观察到任何毒副反应. 特殊毒性实验表明, rhpro-UK 没有致突变和致畸作用.

关键词
重组人尿激酶原
药效学
药理学
毒理学

尿激酶原也叫尿激酶型向溶酶原激活剂(u-PA)广泛分布于人和动物体内, 在体内具有多种生理功能, 它与组织纤溶酶原激活剂(t-PA)和凝血酶及凝血因子对体内的凝血和出血起平衡作用. 此外, 它还参与炎性细胞的迁移、子宫基膜的扩展、卵子受精过程、退化器官的溶解、癌细胞的侵染与扩散, 以及信号传递、神经细胞发育与分化等重要的病理生理过程[1]. 尿激酶原作为新的血栓溶解剂, 用于治疗急性心肌梗死有大量报道, 但国内外有关用于肢体静脉、动脉血和缺血性中风的治疗以及药理学和毒理学研究研

英文引用格式: Zhang Z G, Xiao C Z, Hu X W, et al. Overwiew of investigation of pharmacodynamics, pharmacology, and toxicology of domestic human prourokinase. SCIENTIA SINICA Vitae, 2011, 41: 1024–1029, doi: 10.1360/052011-593

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/052011-593

究只有少量报告. 军事医学科学院生物工程研究所经过 26 年研制的重组人尿激酶原是完全具有自主知识产权的一类新药, 已于 2011 年 4 月 2 日获得新药证书和生产批文. 现将该药的药效学、药理学和毒理学研究结果作一简要介绍.

1　重组人尿激酶原的药效学研究

1.1　不同剂量 rhpro-UK 对家兔纤溶功能的影响

通过对 rhpro-UK 不同剂量(8 万 IU/kg 和 16 万 IU/kg)对家兔纤溶功能的影响并与 UK(8 万 IU/kg)比较实验, 结果表明: 两个剂量 rhpro-UK 和 UK 均能明显缩短优球蛋白溶解时间(ELT)和增加纤维蛋白(原)降解产物(FDP). 相同剂量(8 万 IU/kg)rhpro-UK 对兔体内α_2-AP 和 Fg 的影响明显低于 UK, 而且 rhpro-UK 剂量增至 16 万 IU/kg 时, 对α_2-AP 和 Fg 的影响仍明显低于UK, 统计学有显著性差异. 提示Rhpro-UK有较大安全范围. rhpro-UK 对家兔对家兔肺血栓的溶解结果列于表 1.

1.2　rhpro-UK 对家兔外源性血栓的溶栓作用

用体外血栓形成仪制备血栓, 染色后经颈静脉注入家兔体内, 观察不同剂量 rhpro-UK 的溶栓作用, 并与 UK 进行比较. 结果表明, rhpro-UK 与 UK 同等剂量的溶栓作用相似, rhpro-UK 的溶血栓功能随剂量增加而增强, 其溶栓率与对照组相比有显著性差异(P<0.001), 揭示 rhpro-UK 对家兔实验性血栓有明显的溶解作用.

1.3　rhpro-UK 对猪冠状动脉血栓的溶栓作用

用电刺激中国小猪冠状动脉形成人工血栓, 用不同剂量 rhpro-UK 进行溶栓治疗, 经冠状动脉病理切片, 显微电视成像印像技术、多媒体图象分析分析溶栓效果, 测定心外膜电图、心肌组织化学染色、血清生化学肌酸激酶(CK)及同功酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)、优球蛋白溶解时间(ELT)、出血和凝血时间(BT, CT)、纤溶酶原(PLG)、α_2-抗纤溶酶(α_2-AP)、纤维蛋白原(Fg)等指标, 观察 rhpro-UK 对上述指标的影响. 结果表明, rhpro-UK 对猪冠脉血栓有显著的溶栓作用, 对猪 Fg, PLG 和α_2-AP 含量均无明显影响.

同时, rhpro-UK 与尿激酶(UK)进行了比较, 结果显示: (1) 相同剂量 rhpro-UK 与 UK 对冠脉血栓的溶解作用、对心肌缺血和心肌梗死及相关生化指标的改善效果相似. rhpro-UK 的作用随剂量增加而增强, 结果如图 1 和 2 所示. (2) rhpro-UK 与 UK 同等剂量(8 万 IU/kg)或高于 UK 剂量(16 万 IU/kg)时, 出血时间、凝血时间、单位时间内出血量均明显低于 UK. (3) UK 可明显降低α_2-AP 含量, rhpro-UK 的两个剂量组均无明显变化.

实验结果揭示, rhpro-UK 和 UK 对猪冠脉血栓均有明显溶解作用, 而 rhpro-UK 对全身纤溶系统没有影响, 其副作用明显低于 UK, 结果见表 2.

2　重组人尿激酶原的药理学研究

通过小鼠、大鼠、犬和豚鼠回肠的一般药理学实验, 结果表明, rhpro-UK 对受试动物的一般行为、状态及中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统、消化系统等均无明显影响. 对出血时间、血小板数量及血小板聚集功能也无明显影响. 仅发现犬实验中手术创面有渗血现象, 实验结束后全身血液有类似肝素化状态.

表 1　rhpro-UK 对实验兔肺血栓的溶解作用($\bar{x}$±SD)

药物分组	剂量(IU/kg)	动物数(只)	注入前栓重(mg)	24 h 后栓重(mg)	溶栓率(%)
对照组	0	8	32.25±2.05	23.88±2.30	25.95±5.42
UK	10000	8	31.75±1.58	15.38±4.96	52.47±14.58
	20000	8	30.25±1.49	13.38±4.72	56.27±14.90
	40000	7	30.43±1.62	9.71±3.25	68.30±9.70
	80000	7	31.43±1.99	11.71±6.29	63.12±18.82
rhpro-UK	10000	5	32.00±2.35	15.40±5.13	52.48±14.47
	20000	8	30.25±1.28	15.88±3.18	51.54±9.75
	40000	8	32.38±1.77	12.88±3.94	59.72±14.19
	80000	8	31.25±1.49	9.50±3.63	69.69±11.25
	160000	8	32.38±1.85	8.25±3.33	74.44±10.25

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/052011-593

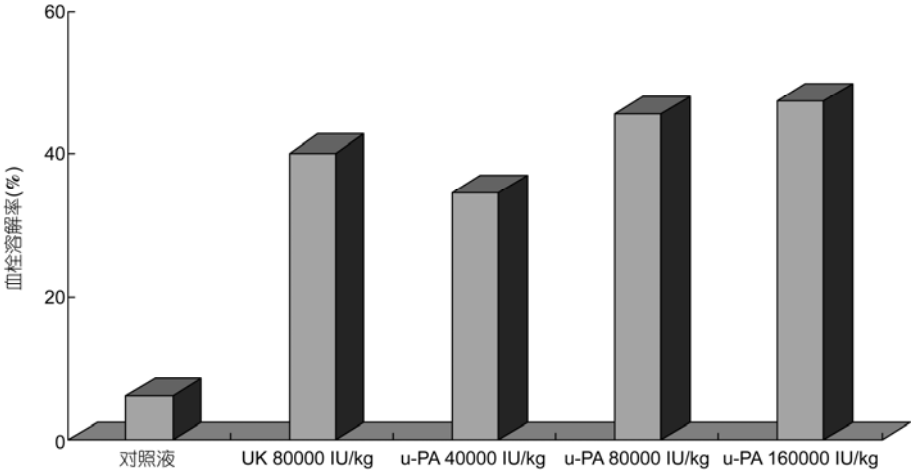

图 1　各组血栓溶解率的比较

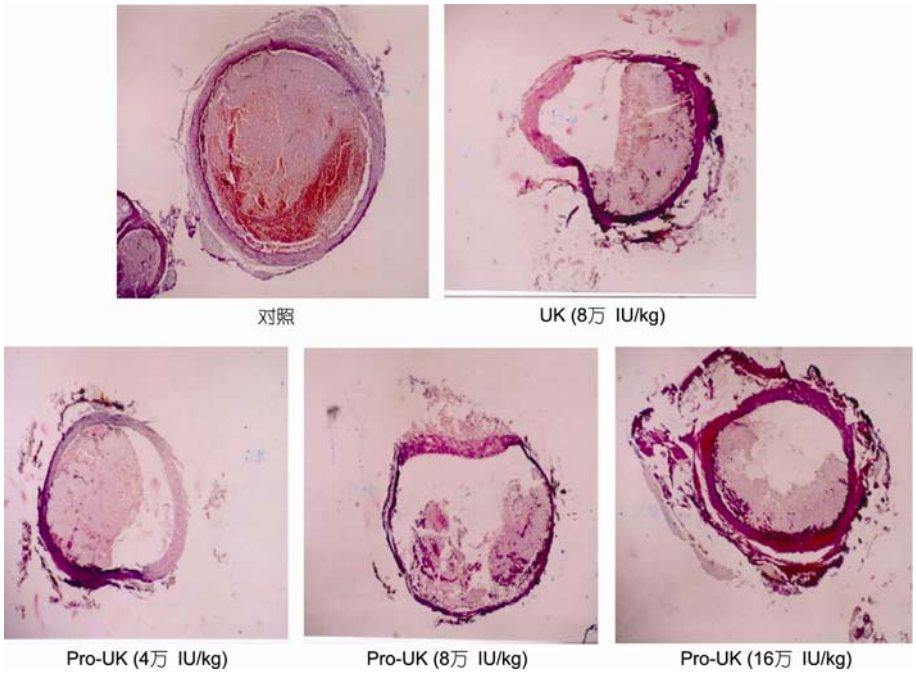

图 2　UK 和 pro-UK 对冠脉血栓溶解的作用

表 2　各给药组冠脉血栓的比较 a)

组别	剂量	动物数	血栓面积/管腔面积	血栓溶解率(%)
对照液组	同体积	6	93.29±5.44	6.71±5.44
UK 组	80000 IU/kg	6	59.88±14.33**	40.12±14.33**
u-PA 组	40000 IU/kg	6	65.57±12.14**	34.43±12.14**
u-PA 组	80000 IU/kg	6	54.44±5.59**	45.56±5.59**
u-PA 组	160000 IU/kg	6	52.73±12.26**	47.27±12.26**

a) 与对照组比较: **示 $P<0.01$

血小板凝结实验结果表明血小板最大聚集率有所降低, 但统计学差异不显著.

3　重组人尿激酶原的毒理学研究

3.1　rhpro-UK 急性毒性实验

重组人尿激酶原(rhpro-UK)半成品经小鼠尾静脉注射进行急性毒性研究. 结果表明, rhpro-UK 的小

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/052011-593

鼠 LD_{50}>97.5 mg/kg(97.5 mg 为尿激酶原制剂最大溶解度的给药剂量); 在 14 天观察期内, 小鼠体重增加正常, 未见任何异常, 没有动物死亡.

3.2 rhpro-UK 的长期毒性实验

(1) 狗的长期毒性研究结果显示, 除了 rhpro-UK 28 mg/kg 和 8 mg/kg 组每次静脉滴注后有一过性牙龈充血, 凝血时间明显延长, Tchol, TP 和 Alb 含量有升高趋势外, 未观察到明显毒性反应, 病理学检查也未观察到药物造成直接的脏器损伤. 2 mg/kg 组未观察到任何毒副反应.

(2) 大鼠的长期毒性实验结果表明, 除 aPTT 时间明显延长, TP, Alb 有暂时升高外, 组织病理学检查及脏器系数测定均未发现与供试品有关的具有毒理学意义的改变.

(3) 家兔 rhpro-UK 注射部位出血时间研究结果表明, 大剂量注射(如 0.8, 3.2 mg/kg)可引起家兔出血时间延长. 出血时间延长的程度与给药剂量、给药次数有关. 给药剂量越大, 给药次数越多, 出血时间和恢复时间越长. 光学显微镜下观察可见该药引起的注射部位局部的炎性损伤和周围组织的炎性肿胀. 这些与给药剂量、给药次数和局部渗漏有关.

从以上结果初步认为, rhpro-UK 在临床上一般为一次性给药, 采用静脉推注结合静脉滴注方式, 人拟用剂量≤1 mg/kg, 在此剂量下不会对人体造成与出血时间有关的明显副作用和明显的局部刺激作用.

3.3 Rhpro-UK 的特殊毒性实验

小鼠骨髓细胞微核实验证实, 对多染红细胞微核率及红系细胞造血均无明显影响, 微核率及 PCE/NCE 值均在正常范围之内.

rhpro-UK 的遗传毒性研究, 用沙门氏菌诱变性实验平皿掺入法检测 rhpro-UK 对测试菌株 TA97, TA98, TA100 和 TA102 的致突变作用. 结果表明, rhpro-UK 在 0.1~2000 ug/皿浓度范围内对沙门氏菌无致基因突变作用.

rhpro-UK 的 CHL 细胞染色体畸变实验 rhpro-UK 对 CHL 细胞染色体畸变率均无明显影响, 也未见诱发 CHL 细胞染色体畸变及数目改变.

rhpro-UK 的生殖毒性研究. 小鼠致畸胎实验结果表明, 小鼠妊娠后第 6~15 天, 每天静注 rhpro-UK 1, 5, 15, 45 mg/kg, 连续 10 天, 除 1 mg/kg 组外, 各剂量组均有流产和母鼠死亡, 1 mg/kg 和 15 mg/kg 组畸形率为 0.9%和 0.7%, 均在正常范围. 5 mg/kg 和 45 mg/kg 组及溶剂对照组存活胎鼠未发现畸形. 1 mg/kg 剂量组个别母鼠仍见宫内轻度出血. 提示, 该药与其他溶栓药一样, 孕妇患者要慎用.

4 讨论

国外对重组尿激酶原的药效学、药理学和毒理学进行了研究. Burke, et al.报道用小鼠骨髓瘤细胞表达的重组尿激酶原(r-proUK)在 39 条 Beagle 狗体内的药效学实验结果[2]. 39 条狗分为 6 组, 用热损伤形成股动脉血栓, 并先用肝素治疗, 然后其中 5 组用 r-proUK 治疗, 总剂量为 80000 U/kg. 50%推注, 50% 15 min 滴注, 溶栓率(52±7)%, 30 min 滴注, 溶栓率(62±7)%; 20%推注, 80% 30 min 滴注, 溶栓率(41±8)%, 60 min 滴注, 溶栓率(66±5)%.

Burke, et al.报告了用重组尿激酶原(r-proUK)动脉和静脉两种途径给药治疗狗血栓模型实验结果[3]. 导管直接给药治疗脉管栓塞更容易被患者接受, 而且病人更愿意选择静脉注射途径. 用 r-proUK 通过动脉滴注和静脉滴注两种途径溶解狗股动脉放射性标记的血栓模型实验在 45 条狗体内进行, 其中 18 条狗用静脉滴注, 剂量从 10000 U/kg 到 100000 U/kg; 第二组 27 条狗用动脉途径给药, 剂量从 300 U/kg 到 10000 U/kg. 结果表明, 在给药后 2 h, 静脉给药组的血栓溶解率从 14%到 70%; 动脉给药组溶栓率从 22%到 79%, 对照组恢复血流只达到 35%. 两个给药途径的最高剂量组的血流恢复达到 77%, 但是静脉给药组的剂量比动脉给药组高 100 倍.

张培祥等人报告了大肠杆菌表达的重组人尿激酶原(prouk)的急性毒性和长期毒性研究结果[4]. 单剂量静脉注射和腹腔注射给药未测出小白鼠的半数致死量(LD_{50}), 改为最大剂量给药. 结果表明 prouk 单剂量静脉注射和腹腔注射给药的小白鼠最大给药剂量不低于每公斤体重 9000 万单位.

长期毒性实验采用食蟹猴, 给药剂量分为 36.0 万 IU/kg, 67.5 万 IU/kg, 135 万 IU/kg 和 270 万 IU/kg 四个剂量组, 每组四只动物, 连续静脉注射 14 天. 结果显示, 36.0 万 IU/kg 组在给药期和恢复期精神状态良好, 一般行为活动正常, 体重、分泌物、食欲及摄食量、心电图、血常规、血液生化、体表观察、尿常

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/052011-593

规和粪便隐血实验等基本正常, 无明显变化. 给药 4 天和恢复期的脏器系数和病理组织学检查表明, 动物脏器、组织均未见药物引起的异常病理改变, 与生理盐水或赋形剂组比较均无明显差异. 67.5, 135 和 270 万 IU/kg 剂量组出现皮下出血、充血、紫癜, 尿、粪便隐血反应阳性以及贫血、心率加快等症状, 给药期和恢复期学中检出少量 prouk 抗体. 结论: prouk 的无毒安全剂量不低于 36.0 万 IU/kg.

陆国才等人报告了小鼠骨髓瘤细胞表达的重组人尿激酶原(rhrhpro-UK)对恒河猴的长期毒性实验[5]. 健康猴按体重随机分为低、中、高 3 个剂量组和对照组 4 个组, 每组 6 只动物, 雌雄各半, 给药剂量分别为 3, 10, 30 mg/kg, 连续静脉注射 14 天, 末次给药后处死一半动物做病理解剖, 另一半停药后继续观察 7 天. 结果显示, 14 天给药后, 给药组的凝血时间(CT)、凝血酶时间(TT)、 (aPTT)、凝血酶原时间(PT)都明显延长, 血浆纤维蛋白原(Fig)明显降低, 且存在量效关系. 21 天后上述指标恢复正常. 给药 14 天和药后 21 天病理组织学检查发现, 每组均有部分动物出现肝、肾淤血, 轻度细胞水肿, 可能是动物隐性感染, 非药物所致. 给药 4 天高、中剂量组可见部分动物肺泡大片或灶性出血, 注射部位静脉内膜增生或坏死、软组织出血、静脉炎及血管周围炎. 21 天给药组肺部组织基本正常, 注射部位的皮肤出血和炎性反应基本消失. 结论: rhrhpro-UK 对恒河猴血液系统有一定的药理毒理作用, 主要表现为后的 CT, TT, aPTT, PT 时间延长, Fig 含量降低, 但这些毒性作用是可逆的. rhrhpro-UK 对猴的安全剂量为 3 mg/kg.

以上的药效学、药理学和毒理学结果与我们的实验结果相似, 表明用 CHO 细胞表达的国产重组人尿激酶原与大肠杆菌和小鼠骨髓瘤细胞表达的尿激酶原性质是相似的.

参考文献

1 胡金勇, 曾英, 桑玉英, 等. 尿激酶型纤溶酶原激活剂的研究. 细胞生物学杂志, 2001, 23: 67–71

2 Burke S E, Lubbers N L, Nelson R A, et al. Comparison of dose regiment for the administratrionh of recombinant pro-urokinase in a Canine Thrombosis Model. Thromb Haemost, 1997, 77: 1025–1030

3 Burke S E, Lubbers N L, Nelson R A, et al. Profile of recombinant pro-urokinase given by Intraaterial versus intravenous routes of administration in a canine thrombosis model. Thromb Haemost, 1999, 81: 301–305

4 张培祥, 刘蓓芳, 方泰慧, 等. 重组人尿激酶原急性毒性和长期毒性的研究. 南京大学学报, 2001, 37: 458–472

5 陆国才, 袁伯俊, 姜华, 等. 重组人尿激酶原对恒河猴的长期毒性研究. 中国药学杂志, 2004, 13: 894–897

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/052011-593

Investigation of Pharmacodynamics, Pharmacology, and Toxicology of Domestic Human Prourokinase

ZHANG ZhengGuang[1], XIAO ChengZu[1], HU XianWen[1], XU ZhaoPing[1], LIU JianXun[2], YANG SuJuan[3], REN JianPing[3], LIAO MingYang[4], SHI XiaoChun[4] & WU BoAn[5]

1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;
2 Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;
3 Institute of Radiation and Irradiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;
4 Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;
5 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

The comparison of the effect of fibrinolytic activity of recombinant human prourokinase (rhpro-UK) and urokinase(UK) with rabbits indicated rhpro-UK and UK all decreased resolution time of globular proteins, and the affect of rhpro-UK on parameter of fibrinolysis of rabbits was less than UK. The solution of thrombin of rhpro-UK *in vitro* was increased with dosage of rhpro-UK, and when rhpro-UK was compared with isodose UK, the difference is significant. Both rhpro-UK and UK all was marked solution of thrombin from Chinese piglets, and it were not evident effect on fibrinogen, plasminogen, and a2-antiplasmin of the piglets. The affect of rhpro-UK on bleeding time, clotting time, bleeding amount of unit time was less than UK. It indicated that the side effect of rhpro-UK was distinguished less than UK. The investigation of pharmacology of ileums of mice, rats, dogs, and guinea pigs indicated that rhpro-UK was not marked affect on behavior, state, central nervous system, cardiovascular system, respiratory system, and digestive system of the tested animals. But tested dogs were bleeding at location of operation, and the blood of the animal was heparinized. The studis of toxicology of rhpro-UK indicated that rhpro-UK was median lethal dose of 97.5 mg/kg in mice. When The Beagle dogs was administed rhpro-UK of 2, 8, 28 mg/kg, the toxic reaction was not observed, except for temporal hyperemia of gum, extend of clotting time, increasing of total cholerythrin, total proteins, albumin of the dogs, the direct damage of organs for the medicine was not observed in examination of pathology in the dosages of 8 and 28 mg/kg, any toxic reaction was not observed in dosage of 2 mg/kg. The special toxic experiments proved that rhpro-UK was not of mutagenesis and teratogenesis.

recombinant-human-prouroinase, pharmacodynamics, pharmacology, toxicology

doi: 10.1360/052011-593

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/052011-593