

重组巴曲酶对猴长期毒性观察

陆国才, 袁伯俊, 姜 华, 赵冠人, 佘佳红, 戴益民, 黄 矛

(第二军医大学基础医学部新药评价中心, 上海 200433)

[摘要] **目的:**观察重组巴曲酶(rBAT)连续 *iv* 30 d 对猴的长期毒性。**方法:**健康恒河猴按体质量随机分为低、中、高剂量组(1.5、5.0 和 15.0 kU/kg)和溶剂对照组($n=6$, 雌雄各半)。连续 30 d 静注给药。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 15 d。观察症状和检测指标包括:(1)一般症状;(2)心电图;(3)凝血时间(CT)等血液学指标;(4)血浆纤维蛋白原含量(Fib)等血液生化指标;(5)尿液检查;(6)骨髓检查;(7)病理检查;(8)抗体检测。**结果:**d15 及 d30 给药后 30 min 采集的血样中, 与 d0 或与溶剂对照组相比, 低、中、高剂量组的 Fib 明显减少, 且有剂量依赖性, 但 d15 及 d30 给药后 24 h 及 d45 采集的血样中上述指标恢复正常。病理组织学检查发现 d30 及 d45 各剂量组均有部分动物肝肾淤血, 细胞轻度水肿, 可能是动物隐性感染;d30 注射部位皮肤出现局部炎症反应, d45 炎症反应基本消失。其余观察指标未见明显异常。d15 到 d45 均可检测到抗 rBAT 非中和抗体。**结论:**rBAT 对猴血液系统有一定的药理毒理作用, 主要表现为使猴低、中、高剂量组 Fib 呈剂量依赖性降低。rBAT 对猴药理毒理作用靶器官为血液系统, 其作用均是可逆的。rBAT 对猴的安全剂量为 1.5 kU/kg。临床使用时应密切注意 rBAT 对血液系统的影响。

[关键词] 重组巴曲酶; 长期毒性; 猴

[中图分类号] R 973.1; Q 789

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2006)05-0521-04

Long-term toxic effect of recombinant batroxobin on *Macaca mulatta*

LU Guo-cai, YUAN Bo-jun, JIANG Hua, ZHAO Guan-ren, SHE Jia-hong, DAI Yi-min, HUANG Mao(Center for New Drug Evaluation, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the long-term (*iv* for 30 days) toxic effect of recombinant batroxobin (rBAT) on *Macaca mulatta*. **Methods:** Twenty-four *Macaca mulatta* (12 male and 12 female) were randomly divided into 4 groups according to their body weights ($n=6$): rBAT treatment groups (1.5, 5.0, 15.0 kU/kg of rBAT once daily for 30 consecutive days through *iv* injection) and acetate buffer treatment group (as control). Half of the animals in each group were sacrificed at the end of medication and the rest were sacrificed after another 15 days' recovery. The general symptoms, the hematological, chemical parameters, urinalysis values, ECG results, bone marrow findings, pathologic changes and the antibody detection were observed or performed in all groups. **Results:** On d15 and d30, the blood samples of each group were collected at 30 min and 24 h after *iv* injection. Compared with control group or with d0 data of each corresponding group, the fibrinogen (Fib) was significantly decreased 30 min after *iv* injection of rBAT, and the decrease was in a dose-dependent manner. Fib returned to the normal level 24 h after *iv* injection. Histopathological examination showed congestion and slight edema of liver and kidney cells in each group, probably due to latent infection of the animals. On d30, there was local inflammatory reaction in the injection sites of some animals in each group, but none was found on d45. Non-neutralizing antibodies to rBAT were continuously detected from d15 to d45. **Conclusion:** rBAT has pharmacological and toxicological effects on hematology system of *Macaca mulatta*. It can dose-dependently decrease Fib. The target organ of rBAT is the hematology system and the effect of rBAT is reversible. The safety dose of rBAT for *Macaca mulatta* is 1.5 kU/kg. Attention should be given when rBAT is used clinically.

[KEY WORDS] recombinant batroxobin; long-term toxicity; *Macaca mulatta*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 521-524]

重组巴曲酶(rBAT)是我国自主开发的基因工程新型止血药, 其作用类似立止血和蛇毒中的类凝血酶, 临床拟用于治疗出血性疾病^[1]。为了观察由于 rBAT 蓄积而对机体可能产生的毒性反应及死亡情况, 找出毒性反应的靶器官, 并了解毒性损害可逆与否, 确定 rBAT 对猴的无毒性反应剂量, 为拟定人用安全剂量提供实验依据, 本研究评价了 rBAT 对恒河猴 *iv*, qd, 连续 30 d 的长期毒性。

1 材料和方法

1.1 药物 rBAT 为白色粉末, 上海万兴生物制药有限公司提供, 批号: 20030601, 蛋白含量: 0.1 mg/支, 比活性: 2 000 kU/mg, 纯度 > 98%, 0~4℃ 保

[作者简介] 陆国才, 副教授。

E-mail: newdrug@smmu.edu.cn

存,使用时用醋酸缓冲液配制成相应浓度。

1.2 动物 恒河猴,3~4岁,体质量4.0~6.0 kg,由江苏苏州西山中科实验动物有限公司提供,动物许可证号为SCXK(苏)2002-0007。实验前在动物房驯养1个月。经一般行为观察,结核菌素试验和2次血液、血液生化和心电图检查。通过检疫选用符合国家普通级实验猴作为实验动物。动物雌、雄分别按体质量随机分4组:溶剂对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。每组6只,雌、雄各半。

1.3 给药剂量及方法^[2] 根据药效学剂量和参考对猴急性毒性试验结果,给药组共设3个剂量组,给药剂量分别为1.5、5.0和15.0 kU/kg。给药容积为1.0 ml/kg,溶剂对照组给予1.0 ml/kg醋酸缓冲液(pH 4.8)。每天上午8时开始前肢内侧皮下头静脉或后肢外侧皮下小隐静脉交替给药,连续给药30 d。

1.4 观察指标

1.4.1 一般情况 如有动物死亡,则记录死亡数,并及时解剖了解死因。观察猴的外观、行为、活动、步态、精神、食量、体质量、大便、肛温、呼吸、瞳孔、皮毛、有无流涎、恶心、呕吐等,注射部位有无出血、水肿、感染等。

1.4.2 心电图 猴仰卧固定于工作台上,用XD-7100型心电图机描记肢体II导联。观察心率、P波电压、P-R间期、R波电压、QRS时间、ST段、T波电压和Q-T间期共8项指标的变化。

1.4.3 血液学 每只猴取静脉血,用美国产CELL-DYN 610型全自动血球计数仪测定:红细胞(RBC)计数、血红蛋白(Hb)定量、红细胞压积(Hct)、红细胞平均容积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)、红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)、血小板(Plat)计数、白细胞(WBC)计数及分类(淋巴细胞、粒细胞和单核细胞)共11项。另用2滴血记录凝血时间(CT)。

1.4.4 血液生化 静脉取血,分离血清,用意大利产Unifast-2半自动生化分析仪,测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(Tbill)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、血糖(Glu)、总胆固醇(Tch)。同时取抗凝血,分离血浆,用上海医科大学华山医院技协试剂所提供的试剂盒检测凝血酶(TT)、部分凝血活酶(aPTT)、凝血酶原时间(PT)、血浆纤维蛋白原含量(Fib)。共检测14项指标。

1.4.5 尿液分析 用micro AUTION MA4260自动尿液分析仪(日本),测试尿液葡萄糖、蛋白质、

胆红素、尿胆原、pH、比重、红细胞、酮体、亚硝酸盐和白细胞共10项。

1.4.6 骨髓检查 于解剖的同时在胸骨取材,涂片,染色,镜检。

1.4.7 大体病理检查 末次给药后24 h *iv* 3%戊巴比妥钠麻醉,用颈总动脉放血及气管切断法每组处死一半猴,其余猴停药观察15 d后同法处死病检。大体观察各脏器有无病变。对心、肝、脾、肺、肾、脑、肾上腺、胸腺、甲状腺、前列腺、睾丸、子宫及卵巢13个脏器称量,分别计算各脏器的相对质量。

1.4.8 组织病理检查 取心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、十二指肠、回肠、结肠、垂体、甲状腺、肾上腺、胸腺、胰腺、肠系膜淋巴结、前列腺、膀胱、睾丸及附睾、子宫及卵巢、眼球、视神经和注射部位血管组织,立即固定于10%甲醛溶液中,常规包埋、切片、染色。观察各剂量组和对照组有无病理变化。

1.4.9 抗体检测 于d0、d15、d30及d45用ELISA法分别测定血清抗rBAT抗体,选择抗体效价高的猴血清与rBAT原液等体积混匀后,置37℃水浴中孵育1 h后,测定rBAT的生物学活性,判断抗体有无中和性^[3]。

1.5 统计学处理 用SPSS 10.0进行统计学处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。自身对照采用配对 t 检验,各试验组与对照组间采用ANOVA的Dunnett t 检验。

2 结果

2.1 一般指标 与溶剂对照组及d0相比,给药各剂量组食量级别、体质量、肛温、呼吸、瞳孔均无明显差异,表明长期给予rBAT对猴的食量、体质量、肛温、呼吸、瞳孔无明显影响。各组猴外观、行为、活动、步态、精神、食欲、大小便和皮毛等无明显变化,也无恶心、呕吐、活动受限、震颤和共济失调等症状。注射部位无明显出血、水肿、感染等病变。

2.2 心电图 无论是给药组与对照组、还是给药后与d0相比,心率、P波电压、P-R间期、R波电压、QRS时间、ST段、T波电压和Q-T间期均无统计学差异,表明长期给予rBAT对猴的心率、心电图均无明显影响。

2.3 血液学检查 RBC、Hb、HCT、MCV、MCH、MCHC、Plat、WBC及其分类、CT在各组间及给药前后无明显变化。表明rBAT对这些血液学指标无明显影响。

2.4 血液生化指标 ALT、AST、ALP、Tbill、BUN、Cr、TP、Alb、Glu、Tch、PT、TT和aPTT各组

间相比或给药前后相比均无明显变化。d15 及 d30 给药后 30 min 采集的血样中, 与 d0 及与溶剂对照组相比, 低、中、高剂量组的 Fib 明显减少, 且呈剂量

依赖性降低, 但 d15 及 d30 给药后 24 h 及 d45 的血样中, Fib 恢复正常。检测结果见表 1。

表 1 重组巴曲酶对猴 Fib 的影响

Tab 1 Effect of recombinant batroxobin on fibrinogen in *Macaca mulatta*

(n=6, $\bar{x} \pm s, \rho_B/g \cdot L^{-1}$)

Group	d0	d15		d30		d45
		30 min after medication	24 h after medication	30 min after medication	24 h after medication	
Control	2.89±0.45	3.02±0.51	2.98±0.44	2.99±0.52	3.12±0.67	3.08±0.73
Low dosage	2.81±0.45	2.01±0.62*△	2.73±0.46	2.07±0.61*△	2.69±0.31	2.72±0.36
Median dosage	2.84±0.55	1.77±0.46**△△	2.71±0.59	2.01±0.11**△△	2.73±0.46	2.76±0.48
Large dosage	2.90±0.41	1.49±0.36**△△	2.65±0.27	1.52±0.37**△△	2.55±0.21	2.70±0.21

* P<0.05, ** P<0.01 vs control group; △P<0.05, △△P<0.01 vs d0

2.5 尿液检查 尿液中葡萄糖、蛋白质、胆红素、尿胆原、pH、比重、红细胞、酮体、亚硝酸盐和白细胞 10 项检查结果给药前后及组间比较, 均无明显差异, 且均在正常范围内波动。表明 rBAT 对猴尿中上述指标无明显影响。

2.6 骨髓检查 给药后 30 d、停药后 15 d, 各剂量组粒细胞系各阶段均可见, 形态、大小、比例均无异常, 全片可见巨核细胞 40~50 个, 颗粒型为主, 成熟型周边可见血小板形成, 全片均可见散在血小板。红系各阶段比例基本正常, 形态、大小无异常。粒红比例正常, 为(1.3~3.7):1。淋巴、单核、浆细胞形态、比例正常, 未见寄生虫感染及异常骨髓细胞。结果表明 rBAT 对猴的骨髓系无明显影响。

2.7 大体病理检查 d30 及 d45 各组的绝对脏器质量、相对脏器质量与对照组相比均无明显的差异。表明 rBAT 对猴的各脏器无影响。

2.8 组织病理检查 d30 及 d45 各剂量组均有部分动物肝肾淤血, 细胞轻度水肿。d30 各组均可见部分动物注射部位皮肤出现局部炎症反应, d45 注射部位皮肤的炎症反应消失。其余器官均未见病变。因上述病变分布在包括溶剂对照组在内的各组动物中, 结合肝、肾相关的各项生化指标检测未见明显异常, 故认为这些病变的出现可能是动物的自身感染, 非药物所致。注射部位局部炎症可能是给药时针头机械刺激及动物不配合而引起的药物渗漏造成的。肝、肾组织及注射部位的病理变化见表 2。

表 2 猴给药重组巴曲酶后病理组织学变化

Tab 2 Histopathological findings in *Macaca mulatta* treated with recombinant batroxobin

(N)

Group		d30[Dose (kU/kg)]				d45[Dose (kU/kg)]			
		0	1.5	5.0	15.0	0	1.5	5.0	15.0
Liver	Hydropic degeneration	2	1	2	2	1	1	1	2
	Interstitial inflammation	2	1	2	2	1	1	2	2
Kidney	Hydropic degeneration	1	1	2	1	1	1	1	1
	Interstitial inflammation	0	1	2	1	0	0	0	0
Injection site	Local inflammation	1	1	0	2	1	1	1	1

Three *Macaca mulatta* in each group

2.9 抗体检测 d15 高、中剂量组可检测到血清抗 rBAT 抗体, d30 和 d45 各剂量组均可检测到抗 rBAT 抗体。抗体效价较高的猴血清与 rBAT 原液等体积混匀后, 置 37℃ 水浴中孵育 1 h 后, 测得 rBAT 的生物学活性未见降低, 表明抗 rBAT 抗体为非中和性抗体。

3 讨论

本研究主要观察了 rBAT 1.5 ~ 15.0 kU/kg 连续 iv 猴 30 d 后的长期毒性, 发现该药 d15 及 d30 给药后 30 min Fib 减少, 且呈剂量依赖性降低, 但

给药后 24 h 上述指标均恢复正常。这可能与 rBAT *iv* 半衰期较短有关,药代动力学实验观察到 rBAT *iv* 猴 $T_{1/2\beta}$ 为 1.9 ~ 2.8 h,国外也报道类凝血酶 *iv* 大鼠 $T_{1/2\beta}$ 为 3.9 ± 0.7 h^[3]。rBAT 临床拟用剂量为 0.05 kU/kg,本试验高、中、低剂量分别相当于临床拟用剂量的 300、100、30 倍,低剂量也高于药效学最低有效剂量,且观察到了相应的药理毒理作用,故这 3 个剂量已满足长期毒性试验关于给药剂量的要求。

与溶剂对照组及 d0 相比,低剂量组 d15 及 d30 给药后 30 min Fib 减少明显 ($P < 0.05$),而中、高剂量组 d15 及 d30 给药后 30 min Fib 减少非常显著 ($P < 0.01$),因此 rBAT 对猴的安全剂量暂定为 1.5 kU/kg 较合适。由于影响 CT 结果的因素较多,本试验中 CT 指标未出现统计学有意义的变化,而另一药效学研究中 rBAT 5.0 kU/kg 可使大鼠 CT 缩短^[4]。

本中心在对 rBAT 猴急性毒性试验时发现,猴单次 *iv* 200 kU/kg 时,CT、PT、aPTT 延长,Fib 减少,表明 rBAT 大剂量给药时可导致出血倾向,因此 rBAT 对凝血系统的作用具有双向性,这与我们大鼠实验观察到的结果相一致^[4]。

rBAT 具有凝血酶样作用,能直接使 Fib 溶液和离体抗凝血浆凝固。HPLC 分析显示,与凝血酶对 Fib 的作用不同,rBAT 仅能释放 Fib 的纤维蛋白肽 A,而对肽 B 无释放作用^[5,6]。同时,凝血酶能激活凝血因子 X III,而 rBAT 不能^[7]。因此 rBAT 降解 Fib 的纤维蛋白肽 A 以后,形成纤维蛋白 I 单体 (F I m),在出血部位 F I m 逐渐增多,Fib 逐渐减少,当 F I m 与 Fib 比例大于 1 : 5 时,即促发一系列的酶促反应,从而促进止血^[8]。而在体内血管内膜和血流正常的情况下,由于 rBAT 只能裂解 Fib 的纤维蛋白肽 A,形成的纤维蛋白较松散,而且

rBAT 不能激活凝血因子 XIII,因此形成的纤维蛋白很快被体内的纤溶系统所溶解^[1],而大剂量使用 rBAT 时,可因上述机制导致 Fib 的大量消耗,从而产生抗凝作用。

因此,rBAT 1.5 ~ 15.0 kU/kg 连续 *iv* 猴 30 d,对猴血液系统有一定的药理毒理作用。rBAT 对猴毒性作用的靶器官为血液系统,其作用均是可逆的。rBAT 对猴的安全剂量为 1.5 kU/kg。临床使用时应密切注意 rBAT 对血液系统特别是对凝血系统的影响,加强对 Fib 等指标的监测,并还应防止大剂量用药时引起的出血倾向。

[参考文献]

[1] Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis[J]. *Toxicon*, 2005,45:1171-1181.
 [2] 袁伯俊. 新药评价基础[M]. 上海:第二军医大学出版社, 2002:68-79.
 [3] Zhao H, Zheng J, Jiang Z. Pharmacokinetics of thrombin-like enzyme from venom of *Agkistrodon halys ussuriensis* Emelianov determined by ELISA in the rat[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 1821-1826.
 [4] 赵冠人,袁伯俊,陆国才,等. 重组巴曲酶(rBAT)止血作用实验观察[J]. *中国新药杂志*, 2005,14:435-437.
 [5] You WK, Choi WS, Koh YS, et al. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris* [J]. *FEBS Lett*, 2004, 571(1-3): 67-73.
 [6] Blombäck B, Bark N. Fibrinopeptides and fibrin gel structure [J]. *Biophys Chemist*, 2004, 112(2-3):147-151.
 [7] Magalhaes A, Ferreira RN, Richardson M, et al. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003, 136: 255-266.
 [8] 康佐文,时凯,黄国章. 立止血的酶学特性及其作用机理[J]. *蛇志*, 2001, 13: 59-61.

[收稿日期] 2005-09-09

[修回日期] 2006-03-22

[本文编辑] 尹 荼

Antitumor activity of crude extract and fractions from root tuber of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight

Shan L, Zhang WD, Zhang C, Liu RH, Su J, Zhou Y (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Antitumor activity of the ethanol extract from the root tuber of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight and four fractions of the ethanol extract were investigated, both *in vitro* and *in vivo*. The five samples exhibited cytotoxic activity on human tumor cell lines K562, SHG44, HCT-8, A549, PC3, *in vitro* and inhibition in mouse implanted sarcoma S180, *in vivo*. Among the five samples, fraction E was noted to be of the highest antitumor activity.

[Phytother Res, 2005, 19: 259-261]