

文章编号:1673-1689(2009)04-0462-04

## 玉足海参糖胺聚糖对血液中钙离子的影响

朱伟, 张家骥<sup>\*1</sup>, 蒋毅<sup>2</sup>, 朱劼<sup>1</sup>, 任蓓霞<sup>1</sup>, 龚逸奕<sup>1</sup>

(1. 江南大学医药学院, 江苏无锡 214122; 2. 上海开润生物医药有限公司, 上海 200000)

**摘要:** 研究玉足海参糖胺聚糖(GAG)对血液中钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )浓度的影响。健康家兔耳缘静脉取血进行体外复钙凝血实验,考察GAG对复钙凝血时间的影响。用GAG浸泡、烘干后的毛细管进行小鼠眼眶后静脉丛取血,考察GAG对取血过程中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响。考察静脉注射连续给药一周后,GAG对大鼠血液中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响。GAG对复钙凝血时间的延长可随足够 $\text{Ca}^{2+}$ 的加入而减小。用GAG浸泡、烘干后的毛细管对小鼠眼眶后静脉丛进行取血,发现GAG可显著降低血液中 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度。

**关键词:** 糖胺聚糖; 抗凝血; 聚阴离子; 钙离子

**中图分类号:** TS 201.4

**文献标识码:** A

### Effect of Holothurian Glycosaminoglycan Extracted from Sea Cucumber on Calcium in Blood

ZHU Wei<sup>1</sup>, ZHANG Jia-li<sup>\*1</sup>, JIANG Yi<sup>2</sup>, ZHU Jie<sup>1</sup>, REN Bei-xia, GONG Yi-yi

(1. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Shanghai Kairun Biomedical Company Limited, Shanghai 200000, China)

**Abstract:** The objective of this manuscript was to investigate the effect of holothurian glycosaminoglycan (GAG) extracted from sea cucumber on the content of calcium ions( $\text{Ca}^{2+}$ ) in blood with rabbit as animal model. It was found that the  $\text{Ca}^{2+}$  content was reduced remarkably with the soaked capillaries and also reduced significantly after i. v. drug administration of GAG for one week.

**Key words:** glycosaminoglycan, anticoagulation, polyanion, calcium ion

玉足海参糖胺聚糖(holothurian glycosaminoglycan, GAG)是从中国南海一带海域广泛存在的玉足海参体壁中提取的一种含岩藻糖分支的糖胺聚糖<sup>[1]</sup>,在临床上主要用于血栓性疾病的预防和治疗。实验和临床研究发现,GAG可通过多种机制发挥其抗凝血和抗血栓作用,具有明显的抗凝血、

抗血栓、降低血液黏度和降低血脂等作用<sup>[2-5]</sup>。

$\text{Ca}^{2+}$ 是血液中极其重要的活性离子,作为凝血因子IV在凝血过程中发挥极其重要的作用,凝血因子IX、X等的激活及相关凝血因子复合物/激活物的形成均必需 $\text{Ca}^{2+}$ 的参与,凝血酶(II)及纤维蛋白多聚体的形成中 $\text{Ca}^{2+}$ 也是必不可少的,可以说

收稿日期:2008-05-23

基金项目:国家 863 计划项目(2006AA090403)。

\* 通讯作者: 张家骥(1962-),女,江苏宝应人,药理学博士,副教授,主要从事微生物制药、生化药理学及药理学方向的研究。Email:9989card@163.com

Ca<sup>2+</sup>几乎参与了血液凝固的整个过程<sup>[6]</sup>。枸橼酸钠等体外抗凝血药,就是通过其酸根离子与血中Ca<sup>2+</sup>形成难解离的可溶性络合物枸橼酸钙等,致使血中Ca<sup>2+</sup>减少,阻止凝血酶原转化为凝血酶<sup>[7]</sup>。因此,可以认为一定程度上降低血液中Ca<sup>2+</sup>浓度,会达到一定的抗凝血作用。糖胺聚糖是一类富含硫酸基团、具有生物活性的聚阴离子多糖,对K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等具有较大的亲和力,能调节这些离子在组织中的分布。诸葛健等曾指出,多数功能性多糖的抗凝血活性与其硫酸基含量相关,且其活性随硫酸取代基的增加而增加<sup>[8]</sup>。据文献报道,GAG的硫酸基含量较肝素等其他糖胺聚糖明显偏高。由于GAG对血液中Ca<sup>2+</sup>的作用至今未见有报道,因此,实验通过体内、体外实验研究了GAG对血液中Ca<sup>2+</sup>浓度的影响与分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选用300~400 g的清洁级SD雄性大鼠;购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0003;清洁级昆明种小鼠:雄性,体重20~30 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2007-0005;家兔:雄性,体重(2.5±0.2) kg,购自无锡市惠山江南实验动物场,许可证号:SCXK(沪)2002-0006。

### 1.2 药品与主要实验仪器

肝素钠:上海化学试剂公司产品,(900416);钙测定试剂盒:南京建成生物工程研究所生产;SP-752型紫外可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司生产。

### 1.3 GAG对兔离体复钙凝血时间的影响

体外复钙凝血实验方法参照药理学实验<sup>[9]</sup>。实验中采用每次加入10 g/L和3 g/L两种不同质量浓度Ca<sup>2+</sup>试液进行实验,比较两者实验结果,考察GAG对兔离体复钙凝血时间的影响与血液中Ca<sup>2+</sup>质量浓度是否相关。

### 1.4 GAG对小鼠眼眶后静脉丛取血过程中血液中Ca<sup>2+</sup>质量浓度的影响

实验将毛细管置于不同抗凝剂(10 g/L草酸钾组、50 g/L草酸钾组、38 g/L枸橼酸钠,1 g/LGAG组、2 g/L肝素钠组)中浸泡24 h,烘干备用。60只小鼠随机分为6组,每组10只,用烘干的毛细管对小鼠进行眼眶后静脉丛取血0.2 mL于一次性塑料离心管中,3 000 r/min离心10 min,取上清液,用甲基百里酚蓝比色法测定血清中的Ca<sup>2+</sup>质量浓度,观

察各抗凝剂浸泡、烘干后的毛细管在取血过程中是否对血液中Ca<sup>2+</sup>质量浓度产生影响,实验中以浸泡生理盐水的毛细管为空白对照组。

### 1.5 GAG连续给药后对大鼠血液中Ca<sup>2+</sup>质量浓度的影响

40只大鼠随机分为正常对照组、GAG低剂量组、GAG高剂量组、肝素钠组,每组10只。尾静脉注射给药,连续一周。正常对照组给予生理盐水;GAG高、低剂量组分别将GAG冻干粉针以蒸馏水配成2 g/L、1 g/L溶液,给药剂量分别为2 mg/(kg·d)、1 mg/(kg·d),相当于60 kg成人临床给药剂量(每天10~20 mg,连续一周)的最高、最低用量;肝素钠组将肝素钠以蒸馏水配成1 g/L溶液,给药剂量1 mg/(kg·d)。最后一次给药后,眼眶后静脉丛取血备查血液Ca<sup>2+</sup>质量浓度。

### 1.6 统计学处理

数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 GAG对体外复钙凝血时间的影响

GAG对体外复钙凝血时间影响的结果见表1,10 g/L Ca<sup>2+</sup>组与3 g/L Ca<sup>2+</sup>组相比,GAG延长凝血时间显著缩短,即当向血液中加入足够Ca<sup>2+</sup>时,GAG延长凝血时间的能力减弱。这与枸橼酸钠组相似,不同之处在于枸橼酸钠各浓度组在加入充足Ca<sup>2+</sup>后几乎在同一时刻出现凝血,表明GAG的抗凝血、抗血栓作用并不完全体现为其对血液中Ca<sup>2+</sup>的影响,这与已经揭示的GAG可通过多种机制发挥其抗凝血、抗血栓作用结果一致。实验中发现10 g/L Ca<sup>2+</sup>与3 g/L Ca<sup>2+</sup>对肝素的抗凝血作用几乎无影响。

表1 GAG对体外复钙凝血时间的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Effect of GAG on calcification coagulation time in vitro( $\bar{x} \pm s$ )

药物浓度/ (g/L)	复钙凝血时间/s	
	3 g/L Ca <sup>2+</sup>	10 g/L Ca <sup>2+</sup>
生理盐水	83±20	80±17
枸橼酸钠		
4.75	120±21	93±10**
9.50	160±15	83±13**
19.00	187±13	90±0**
38.00	20 min+123±18	90±5**

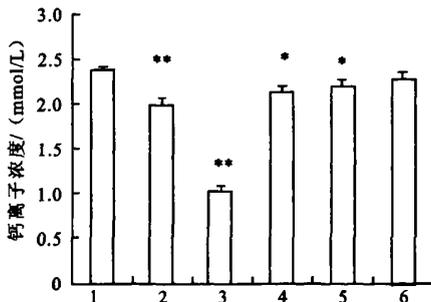
续表1

药物浓度/ (g/L)	复钙凝血时间/s	
	3 g/L Ca <sup>2+</sup>	10 g/L Ca <sup>2+</sup>
GAG		
0.10	234±15	138±18**
0.25	627±20	390±22**
0.50	100 min+137±16	40 min+127±13**
1.00	—	100 min+120±30**
肝素钠		
0.02	210±21	197±26
0.04	637±25	623±29
0.07	—	—
0.13	—	—

注:每隔30 s观察一次,如20 min不出现凝血,则再加入上述质量浓度的Ca<sup>2+</sup>,重新观察,2 h不出现凝血,则视为不凝(记作—),各组数据均为平行操作9次后取平均值。与3 g/L Ca<sup>2+</sup>组比较,\*\*P<0.01

## 2.2 GAG浸泡的毛细血管对眼眶后静脉丛取血过程中血液Ca<sup>2+</sup>的影响

GAG浸泡的毛细血管对眼眶后静脉丛取血过程中血液Ca<sup>2+</sup>的影响见图1。如图1所示,经1 g/L GAG浸泡过的毛细血管在小鼠眼眶后静脉丛取血过程中能显著降低血液中Ca<sup>2+</sup>质量浓度,其作用强度稍弱于38 g/L枸橼酸钠,实验中发现2 g/L肝素钠组一定程度上可降低血液中Ca<sup>2+</sup>浓度,但无显著影响,说明肝素钠对血液中Ca<sup>2+</sup>的影响不及GAG。



图中,1为空白组,2为10 g/L草酸钾组,3为50 g/L草酸钾组,4为38 g/L枸橼酸钠,5为1 g/L GAG组,6为2 g/L肝素钠组,与空白组比较,\*P<0.05;\*\*P<0.01

图1 GAG浸泡的毛细血管对取血过程中血液Ca<sup>2+</sup>浓度的影响

Fig. 1 Effect on the content of Ca<sup>2+</sup> in sampling blood with GAG soaked capillaries

## 2.3 GAG连续给药后对实验大鼠血液中Ca<sup>2+</sup>的影响

给药后,取血分离血清,按钙测定试剂盒方法(甲基百里香酚蓝比色法)测定血清中Ca<sup>2+</sup>浓度,其结果见表2。

表2 给药后大鼠血液中Ca<sup>2+</sup>的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 2 Comparation of Ca<sup>2+</sup> in rats' blood after i. v. drug administration

组别	n	Ca <sup>2+</sup> 浓度/(mmol/L)
正常对照组	10	2.06±0.03
肝素钠组	10	2.00±0.03
GAG低剂量组	10	1.91±0.08*
GAG高剂量组	10	1.71±0.19**△*

注:与正常组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01;与肝素钠组比较,△P<0.01;与GAG低剂量组,\*P<0.01;n为实验动物数

## 3 结语

Ca<sup>2+</sup>是凝血过程不可缺的活性离子,若能对凝血过程中Ca<sup>2+</sup>产生显著影响,可能会影响到血液凝固的整个过程。实验通过体内、体外的实验研究发现,GAG可显著降低血液中Ca<sup>2+</sup>浓度。Goto等<sup>[10]</sup>曾给犬股动脉灌注肝素,发现血浆钙离子水平下降,且呈剂量依赖型。实验观察到:大鼠尾静脉连续给药一周后,GAG对血液中Ca<sup>2+</sup>的影响明显强于肝素钠,这可能是由于GAG的硫酸基含量较高。

实验结果表明,GAG可通过屏蔽血液中Ca<sup>2+</sup>延长兔血复钙凝血时间,即可通过作用于血液中Ca<sup>2+</sup>发挥一定的抗凝血作用,实验中未发现肝素钠组有此现象,可能是因为GAG的硫酸基含量较高,且肝素钠发生明显抗凝血作用的浓度较低。Chevalier等<sup>[11]</sup>在报道中指出肝素和硫酸乙酰肝素等作用并调节细胞外蛋白的多数过程均涉及到其与阳离子Ca<sup>2+</sup>或者Mg<sup>2+</sup>的作用,由此想到,肝素、硫酸乙酰肝素等在抗凝血过程中对凝血因子(多数为蛋白质)的调节很有可能涉及到其与血液中Ca<sup>2+</sup>的作用。实验发现,肝素类似物GAG可与血液中Ca<sup>2+</sup>发生明显的作用,能显著降低血液中Ca<sup>2+</sup>浓度,且其作用强度明显强于同剂量的肝素钠。Naqase H等<sup>[4]</sup>曾指出,GAG的抗凝血作用是通过作用于因子IX a-因子Ⅷ a的复合物而抑制因子X的激活,此过程不依赖于抗凝血酶(AT-Ⅲ)和肝素辅因子Ⅱ(Hc-Ⅱ);GAG亦是一种依赖于Hc-Ⅱ的凝血酶抑制剂。由于在上述实验过程中均需加入一定量的

Ca<sup>2+</sup>,由此推测 GAG 对过程中 Ca<sup>2+</sup>的作用很可能能影响到因子 X 的激活和凝血酶(II)的产生,并可影响凝血过程中其他必需 Ca<sup>2+</sup>参与的凝血因子的激活及凝血复合物/激活物的形成。

## 参考文献(References):

- [1] 樊绘曾,陈菊娣,吕培宏,等.玉足海酸性粘多糖的研究[J].药学学报,1983,18:203-208.  
FAN Hui-zeng, CHEN Ju-di, LU Pei-hong, et al. Acidic Polysaccharides From Holo Thuria Leucospilo Ta (Brandt)[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1983, 18: 203-208. (in Chinese)
- [2] Li ZG, Wang HL, Li JZ, et al. Basic and clinical study on the antithrombotic mechanism of glycosaminoglycan extracted from sea cucumber[J]. *Chinese Medical Journal*, 2000, 113(8): 706-711.
- [3] Naqase H, Enjyoji K, Minamiguchi K, et al. Depolymerized holothurian glycosaminoglycan with novel anticoagulant actions; Antithrombin III- and heparin cofactor II-independent inhibition of factor X activation by factor IX a-factor VIIa complex and heparin cofactor II-dependent inhibition of thrombin[J]. *Blood*, 1995, 85: 1527-1534.
- [4] Kitazato K, Kitazato KT, Naqase H, et al. DHG, a new depolymerized holothurian glycosaminoglycan, exerts an antithrombotic effect with less bleeding than unfractionated or low molecular weight heparin in rats[J]. *Thrombosis Research*, 1996, 84: 111-120.
- [5] Kitazato K, Kitazato KT, Sasaki E, et al. Prolonged bleeding time induced by anticoagulant glycosaminoglycans in dogs is associated with the inhibition of thrombin-induced platelet aggregation[J]. *Thrombosis Research*, 2003, 112: 83-91.
- [6] 樊小力. 生理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002. 54-55.
- [7] 周宏源. 药理学[M]. 北京:科学出版社, 2007. 318.
- [8] 诸葛健,赵振锋,方惠英. 功能性多糖的构效关系[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2002, 21(2): 209-212.  
ZHUGE Jian, ZHAO Zhen-feng, FANG Hui-ying. The relationship between structure and function of polysaccharides[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry (Journal of Food Science and Biotechnology)*, 2002, 21(2): 209-212. (in Chinese)
- [9] 刘善庭. 药理学实验[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2003. 87-88.
- [10] Goto H, Kushihashi T, Benson KT, et al. Heparin, protamine, and ionized calcium in vitro and in vivo[J]. *Anesthesia and Analgesia*, 1985, 64: 1081-1084.
- [11] Chevalier F, Lucas R, Angulo J, et al. The heparin- Ca<sup>2+</sup> interaction; the influence of the O-sulfation pattern on binding [J]. *Carbohydrate Research*, 2004, 339: 975-983.

(责任编辑:杨萌)