

低相对分子质量肝素接枝羧甲基纤维素超支化聚合物的合成、表征及活性研究

孙媛媛¹, 邓超², 陈敬华^{*1}

(1. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为提高低分子量肝素的生物活性, 用末端接枝法将末端醛基低相对分子质量肝素 (LMWH-CHO) 缀合在羧甲基纤维素 (CMC) 主链上, 形成一种强负电性的超支化聚合物 (LMWH-grafted CMC, CH)。LMWH-CHO 是通过亚硝酸钠降解法制备获得, 利用 EDC 催化酰胺键生成反应使 CMC 氨基化, 然后通过醛基和氨基的希夫碱反应将二者缀合。运用傅立叶变换红外光谱 (FTIR)、核磁共振 (NMR)、凝胶渗透色谱-多角度激光散射联用技术 (GPC-MALLS) 等方法对产物结构和分子量进行表征, 并对聚合物的抗凝血、抗血栓活性进行了测定。结果显示, 在氨基化 CMC 糖单元与 LMWH-CHO 摩尔比为 1:5 的条件下反应 12 h, 得到接枝率为 23.7% 的 CH 超支化聚合物。该聚合物活化部分凝血活酶时间 (APTT) 为 146 s, 比 LMWH 延长了 25%, 凝血酶原时间 (PT) 为 27.9 s, 约为 LMWH 的 2 倍。此外, 该聚合物抗 Xa IC₅₀ 值为 104.2 nmol/L, 比 LMWH 降低了近 4 倍; 抗 IIa IC₅₀ 值为 642 nmol/L, 远低于 LMWH (>2 000 nmol/L)。表明, 制备的 CH 超支化聚合物抗凝血和抗血栓活性均远优于低相对分子质量肝素。

关键词: 低相对分子质量肝素; 超支化聚合物; 表征; 生物活性

中图分类号: Q 538; R 944.9 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)11—1182—07

Synthesis, Characterization and Biological Activity of a LMWH Hyperbranched Carboxymethylcellulose Polymer

SUN Yuanyuan¹, DENG Chao², CHEN Jinghua^{*1}

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A strongly negative hyperbranched copolymer (LMWH-grafted CMC, CH) was synthesized by low-molecular-weight heparin (LMWH) grafted onto carboxymethylcellulose (CMC) backbone to improve the biological activities of LMWH via multivalent effect. LMWH with an aldehyde group at their reduce ends (LMWH-CHO) was prepared from heparin degradation by nitrous acid. The amide bond was formed between the amino group of EDA and the carboxylic groups of CMC when catalyzed by EDC and the primary amino groups were introduced to the backbone (CMC-NH₂). LMWH-CHO was thus grafted onto CMC-NH₂ by the Schiff-base reaction.

收稿日期: 2015-02-05

基金项目: 教育部博士点基金项目 (20110093110008); 教育部新世纪优秀人才支持计划基金项目 (NCET-10-0435)。

* 通信作者: 陈敬华 (1971—), 男, 湖北黄石人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物大分子和生物功能材料研究。

E-mail: jhchenwhut@126.com

The synthesized hyperbranched polymer was characterized by FTIR, NMR and GPC-MALLS to detect its chemical structure and molecular weight. Furthermore, the anticoagulation activities of the polymer were determined. The results showed that the grafted ratio of CMC was 23.7% with a molar ratio of CMC-NH₂ to LMWH-CHO of 1:5. The APTT and PT of the polymer were 146 s and 27.9 s, respectively, which were 1.25-fold and 2-fold higher compared with that of LMWH. In addition, the IC₅₀ value of anti-factor Xa and anti-factor IIa of the polymer were 104.2 nmol/L and 642 nmol/L, respectively. The values were much lower than those of LMWH. In conclusion, LMWH grafted CMC polymer possessed a better anticoagulation activity than LMWH.

Keywords: low-molecular-weight heparin, hyperbranched polymer, characterization, biological activity

肝素(Heparin)广泛分布在哺乳动物的组织中,如肝、肠粘膜、脾、肺、心等^[1]。肝素作为抗凝血药物已有 80 余年^[2],是最重要抗凝血和抗血栓的生化药物之一^[3]。肝素对心血管外科和血液透析的发展作出了巨大的贡献,然而,在发挥其抗凝和抗栓作用的同时会产生许多难以避免的副作用,如肝素多来源于猪、牛的小肠粘膜,存在潜在的病毒感染危险^[4];剂量个体差异性大,导致合适剂量^[5]和持续给药时间难以确定^[6];并且容易出现因肝素引发的血小板减少症^[4,7]等。针对上述肝素使用过程中出现的问题,人们研制出了新型抗凝血药物——低相对分子质量肝素^[8](LMWH)。与传统肝素相比,LMWH 具有链短、结合部位少,生物利用度高,且半衰期长,个体差异和不确定因素少,剂量易于确定,无需进行血药浓度检测等优点^[9],LMWH 具有较高的抗凝血活性,但抗血栓性能相比普通肝素却大幅降低。因此,对 LMWH 进行修饰以及通过酶法或化学法合成 LMWH 衍生物备受研究者们青睐。Chen 等^[10]采用不同酶组合的方法获得了具有抗凝活性的硫酸乙酰肝素结构,其抗凝活性不如普通肝素但是优于 LMWH。Oh 等^[4]以药物 Arixtra 戊多糖还原端的两个糖单元为单位合成了聚合度可控的 LMWH 类似物。该 LMWH 类似物均一性较好,但是合成步骤复杂,纯化困难,应用受到一定限制。

超支化聚合物是一类可以通过一步法来合成的具有高度支化结构的体型大分子^[11]。与相同质量的线型聚合物相比,它有独特的三维体型分子结构,高度支化的分子链分布,这些结构特点赋予了它不同于线性聚合物的优异性能,如溶解性能^[12]及化学多功能性^[13-14]等。超支化聚合物存在高分布密

度的端基官能团,增加了聚合物的端效应^[15],赋予聚合物更高的生物性能^[16]。Jeong 等人^[17]研究了星形聚环氧乙烷-聚乳酸嵌段聚合物,其具有良好的可吸水性和生物相容性,使得该聚合物成为很好的药物缓释材料。Frey 等^[12]以五氯苯酚甲基丙烯酸酯为骨链,通过酯化反应成功合成了一种超支化聚甘油类似物用作药物载体。

作者以羧甲基纤维素糖链作为核心,利用其糖单元上 C-6 位羧甲基与乙二胺发生酰胺化缩合反应进行氨基化修饰,再与用亚硝酸钠降解法制备的末端醛基化的 LMWH 缀合,形成一类新的强负电性羧甲基纤维素-低相对分子质量肝素(CH)超支化聚合物(图 1)。针对聚合物支链的空间位阻效应及反应体系中较低的聚合基元浓度,合成出长主链的超支化聚合物需要接枝侧链大量过量,产物的分离纯化困难的问题,采用 NaCl 多次超滤方法对产物进行分离纯化,并对纯化产物进行结构表征及生物活性检测。

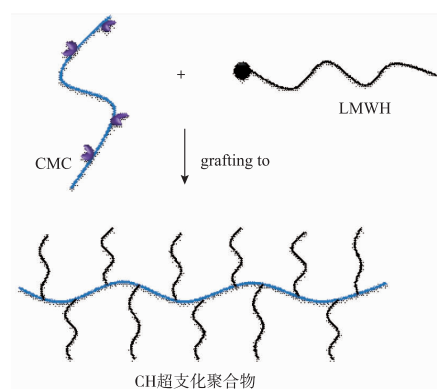


图 1 CH 超支化聚合物的制备示意图

Fig. 1 Schematic representation of the preparation of CH polymer

1 实验材料

1.1 主要试剂

亚硝酸钠、浓硫酸、碳酸氢铵:AR, 购于中国国药集团化学试剂有限公司; 肝素钠, 生化试剂: 购于中国生工生物工程(上海)股份有限公司; 氰基硼氢化钠、羧甲基纤维素钠(CMC)、乙二胺(EDA)1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS): 分析纯, 购于中国 Sigma Aldrich 公司; 活化部分凝血活酶时间(APTT)测定试剂盒(鞣花酸)、凝血酶原时间(PT)测定试剂盒(冻干型): 购于中国上海太阳生物技术有限公司; 肝素抗 Xa 因子测定试剂盒、肝素抗 IIa 因子测定试剂盒: 购于中国北京优尼康生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

FreeZone 2.5 L 冷冻干燥机: 美国 Labconco 公司产品; AUV-1800 型紫外-可见分光光度计: 日本岛津仪器有限公司产品; VATAR-360 傅里叶红外光谱仪: 美国 Thermo 公司产品; Aduance III 400MHz 核磁共振分析仪: 德国布鲁克公司产品; FreeZone 2.5L 冷冻干燥机: 美国 Labconco 公司产品; GPC-DAWN HELEOS 型 18 角度激光光散射联用系统: 美国怀雅特技术公司产品。

2 实验方法

2.1 CH 超支化聚合物的制备

2.1.1 还原末端为醛基的低相对分子质量肝素(LMWH-CHO)的制备 LMWH-CHO 的制备方法参照 Wan^[18] 的亚硝酸降解法。反应得到的澄清溶液在 0.1 mol/L NH_4HCO_3 溶液中透析 (MWCO 3 500 Da), 样品经冻干后混合溴化钾压片, 在波长范围为 500~4 000 cm^{-1} 内进行红外光谱 (FTIR) 表征。

采用 GPC-MALLS 技术对肝素降解前后的相对分子质量及分布进行测定。溶剂与流动相: 0.2 mol/L NaCl (含质量分数 0.01% NaN_3), 经 0.22 μm 滤膜过滤。Wyatt-OPTILAB rEx 示差检测器和 GPC 色谱柱柱温均为 25 $^{\circ}\text{C}$; 流量: 0.5 mL/min; 定量环: 100 μL ; 分别准确称取肝素标准品及 LMWH-CHO 样品 4 mg, 用 2 mL 流动相溶解, 过夜放置, 样品溶液经孔径为 0.22 μm 滤膜过滤后注入 GPC-MALLS 测试系统进行测量。

2.1.2 氨基化羧甲基纤维素钠(CMC-NH₂)的合成

取 200 mg (0.76 mmol) CMC 粉末溶于 50 mL 去离子水中, 加入 218.67 mg EDC (1.14 mmol) 和 87.45 mg NHS (0.76 mmol), 调节体系 pH 至 5.0, 反应 1 h 以活化羧基, 随后逐滴滴入 50 μL 乙二胺 (EDA), 将 pH 调至 7.4 左右, 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 12 h。反应结束后将反应物用截留相对分子质量为 25 000 的透析袋在去离子水中透析, 冷冻干燥后得到 CMC-NH₂, 样品用 ^1H NMR 确认其结构。

2.1.3 CH 产物合成及其分离与纯化 CH 超支化聚合物的合成是通过 Schiff 碱亲核加成反应制备。取 64 mg (0.2 mmol 糖单元) CMC-NH₂ 溶于 40 mL 去离子水中, 与 40 mL 含有 700 mg (0.1 mmol) LMWH-CHO 的水溶液充分混匀, 之后加入 63 mg (0.1 mmol) 氰基硼氢化钠, 在氮气保护下 65 $^{\circ}\text{C}$ 油浴中搅拌反应 12 h。将反应后的溶液在去离子水中透析 (MWCO 1 400 Da), 冷冻干燥得到 CH 超支化聚合物。

称取适量样品用 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液溶解, 用超滤管 (MWCO 100 kDa) 连续超滤多次, 并不断加 NaCl 溶液稀释样品溶液, 用 GPC-MALLS 对样品纯度进行检测, 当出现均一的 LS-RI 检测峰时可视为纯化好的样品, 并用 ^1H -NMR 和紫外可吸收光谱 (UV-vis) 对其产物进行确认。

2.1.4 CH 中 LMWH 接枝率测定 称取 10 mg 肝素标准品溶于 pH 为 7.4 的 PBS 溶液中, 定容至 1 L, 配置成质量浓度为 0.1 mg/mL 的肝素钠母液, 分别取 0.50、1、1.5、2、2.5、3 mL 母液稀释至 10 mL 配成质量浓度分别为 0.005、0.01、0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mL 的肝素钠 PBS 标准溶液, 取标准液和 0.005% 甲苯胺蓝溶液 (0.005%) 各 2.5 mL, 加入到 10 mL 玻璃管中, 充分混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中反应 2 h。取出后加入 4.5 mL 正己烷, 剧烈震荡, 使之充分萃取。以甲苯胺蓝-PBS 溶液为空白, 于 405 nm 处检测各浓度肝素相对应的吸光度值 (Y), 以肝素浓度为横坐标 (X) 绘制肝素标准工作曲线, 根据样品的吸光度值计算出样品中 LMWH 的浓度。

2.2 CH 生物活性检测

2.2.1 活化部分凝血活酶时间 (APTT) 测定 人静脉采血 1.8 mL 于 5 mL 含 0.2 M 3.2% 枸橼酸钠的抗凝试管中, 反复颠倒 3~4 次, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上层黄色血浆。取样品 10 μL 和待测血浆 90 μL 震荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温 5 min 后加入 APTT 试

剂 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。之后加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温的 0.025 mol/L CaCl_2 溶液 0.1 mL, 记录凝固时间。上述测定均于加入试剂的同时启动秒表, 所有试剂使用前均经 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温 5 min。

2.2.2 凝血酶原时间(PT)测定 按 2.2.1 方法收集血浆, 取样品 10 μL 和待测血浆 90 μL 震荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温 3 min 后加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温 PT 试剂 200 μL , 记录凝固时间, 即为 PT 值。

2.2.3 CH 活性检测(抗 Xa 与抗 IIa 活性测定) 采用发色底物分光光度法测定样品抗 Xa 和抗 IIa 活性, 其原理为肝素与抗凝血酶 III (AT III) 形成复合物, 该复合物小于 18 个糖链可抑制与发色底 S-2765 的水解反应; 而大于 18 个糖链的复合物, 可结合凝血酶即 FIIa, 从而抑制与发色底物 S-2238 产生水解反应。未与 AT-Heparin 复合物结合的 FXa 和 FIIa, 会分别与发色底 S-2765 和 S-2238 发生反应, 释放出一种具有颜色的物质 pNA, 通过在 405 nm 下检测 pNA 的浓度, 即可计算出抗 Xa、抗 IIa 因子活性。具体如下:

先制定肝素抗 Xa 与抗 IIa 活性的标准工作曲线: 准备配置 0、0.25、0.5、0.75、1 IU/mL 的肝素标准液, 取标准液 40 μL 肝素标准溶液, 加入 40 μL 抗凝血酶 III, 振荡混匀后, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中反应 2 min, 再加入 40 μL 发色底物, 振荡混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 精确反应 2 min (抗 IIa 精确反应 1 min), 再加入 80 μL 柠檬酸终止液终止反应。使用紫外分光光度计测量肝素标准溶液和 CH 样品 405 nm 处的吸光度值, 绘制标准曲线并计算 CH 的抗 Xa 因子、抗 IIa 因子活性。

3 结果与讨论

3.1 LMWH-CHO 的表征

利用傅里叶变换红外光谱表征亚硝酸钠降解前后肝素官能团的变化。如图 2 所示, 经亚硝酸降解后的肝素在 1 740 cm^{-1} 位置新出现了醛基的 C-O 伸缩振动吸收峰, 说明肝素末端成功被醛基化。在 2 919 cm^{-1} 处出现的弱吸收峰是烷基的 CH 伸缩振动吸收峰; 3 431 cm^{-1} 处出现的宽而强的吸收峰是羟基的 O-H 伸缩振动吸收峰; 在 1 620 cm^{-1} 处出现的强吸收峰是羧基的 C=O 非对称伸缩振动。醛基化前后糖链的主要结构并没有发生改变。

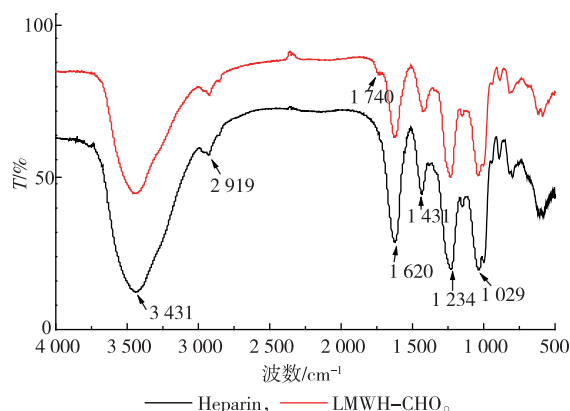


图 2 肝素/LMWH 红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectra of Heparin and LMWH-CHO

如图 3 所示, 与肝素标准品相比, 降解得到的 LMWH-CHO 相对分子质量分散性较好, 洗脱体积后延, 肝素的重均相对分子质量 (M_w) 为 2.009×10^4 g/mol, 降解后 M_w 降为 7.007×10^3 (表 1)。

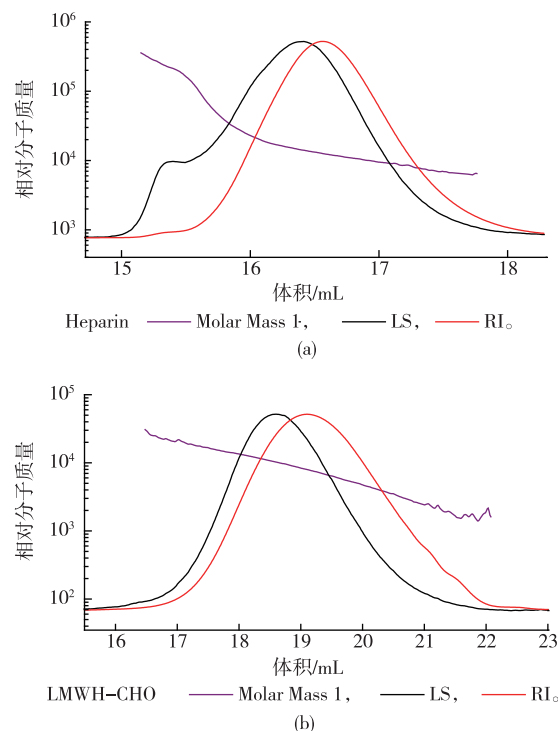


图 3 相对分子质量对洗脱体积作图

Fig. 3 Molar Mass vs. Volume

在 EDC 催化下, CMC 上羧甲基与 EDA 上氨基反应形成酰胺键, 得到 CMC-NH₂。LMWH-CHO 与 CMC-NH₂ 通过 Schiff 碱缀合, 经氰基硼氢化钠还原后得到 CH 聚合物。与未经修饰的 CMC 对比, CMC-NH₂ 的 ¹H-NMR 波谱 (图 4) 在 2.91×10^{-6} 处出现了 EDA 亚甲基氢。根据其峰面积与理论上均未修饰时

CMC C-6 位羧甲基上亚甲基氢峰面积的比值计算, 糖环上 46.7% 的羧甲基成功被氨基化修饰。

表 1 肝素和 LMWH-CHO 相对分子质量大小及其分布结果

Table 1 Molecular weight and distribution of Heparin and LMWH-CHO

样品	M_w	M_n	M_w/M_n
肝素	2.009×10^4 ($\pm 1.525\%$)	1.515×10^4 ($\pm 1.355\%$)	1.326 ($\pm 2.040\%$)
LMWH-CHO	7.007×10^3 ($\pm 0.764\%$)	5.051×10^3 ($\pm 1.448\%$)	1.387 ($\pm 1.638\%$)

注: M_w 为重均相对分子质量, M_n 为数均相对分子质量, M_w/M_n 为相对分子质量分布

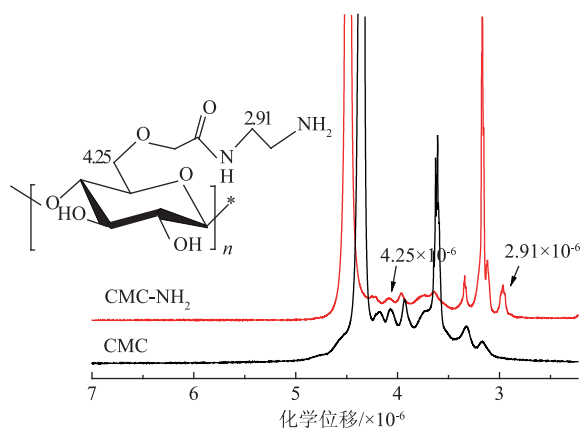


图 4 CMC/CMC-NH₂ 在重水中的 ¹H 核磁共振谱

Fig. 4 ¹H-NMR spectrum of CMC and CMC-NH₂ in D₂O

3.2 CH 聚合物的分离与纯化

产物透析、冻干处理后经 GPC-MALLS 检测, 如图 5(a) 所示, 样品的示差信号显示为非均一峰, 样品中含有两种不同相对分子质量的物质, 且小分子物质占总量的 85%。这可能是由于反应过程 LMWH-CHO 大量过量, 未反应的 LMWH-CHO 以非共价结合方式缠绕在 CMC 链上。经多次加盐解离超滤, 大分子物质比例逐渐提高, 超滤 10 次后, 两种物质的示差峰已明显分离开(图 5(b)), 此时大分子物质占 52%。超滤 15 次后, 大分子物质达到总量的 90%(图 5(c)), 继续超滤, 得到示差信号均一的大分子聚合物(图 5(d))。

3.3 CH 结构表征

样品的紫外可见光谱图见图 6, 与肝素标准品相比, LMWH-CHO 在波长 250 nm 左右有很强的吸光值, 此处为醛基不饱和键的紫外吸收特征峰。通过 LMWH-CHO 上的醛基与 CMC 上的氨基形成希

夫碱结构缀合后, 醛基特征峰消失, 证明 CH 中没有未反应的 LMWH-CHO 残留。

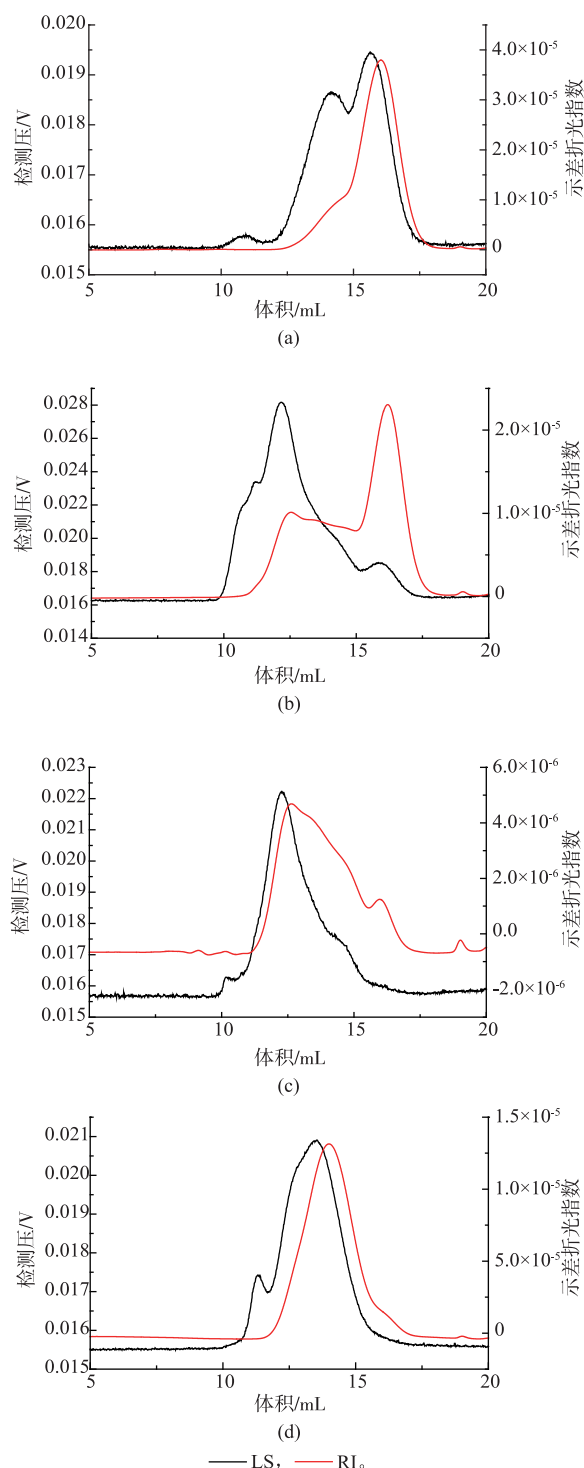


图 5 体积排阻色谱与多角度光散射仪联用色谱图

Fig. 5 SEC-MALLS chromatograms of samples

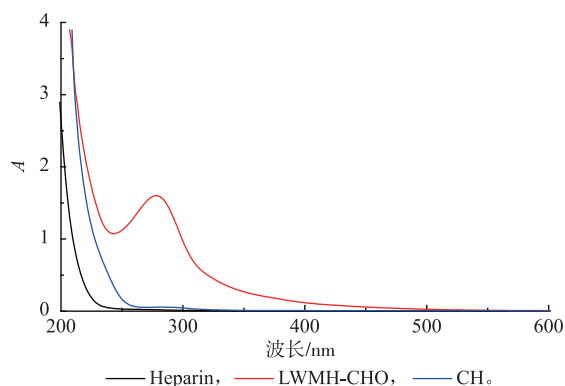


图6 样品的紫外可见光谱

Fig. 6 UV-Vis curve of samples

CH聚合物的成功合成还可从 ^1H -NMR波谱(图7)证明,由于肝素具有很强的不均一性,且CMC和LMWH-CHO糖链上H在 $3\times 10^{-6}\sim 4\times 10^{-6}$ 处有多处重合,用NMR分析整个CH样品结构非常困难。但是CH样品的 ^1H -NMR波谱中明显既有肝素的特征峰也有CMC的特征峰, 2.91×10^{-6} (b)为CMC- NH_2 上乙二胺亚甲基氢, 3.51×10^{-6} (d)为CMC C-5位氢, 2.05×10^{-6} 为肝素酰胺上的氢(a), $4.5\times 10^{-6}\sim 5.5\times 10^{-6}$ 为肝素糖链H的特征峰(f,g)。

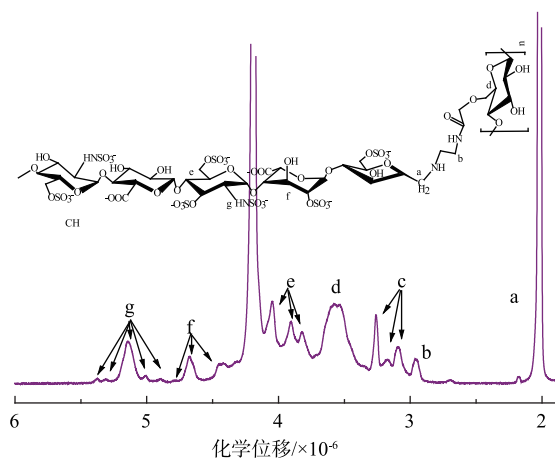


图7 CH在重水中的 ^1H 核磁图谱

Fig. 7 ^1H -NMR spectrum of CH in D_2O

3.4 CH中肝素结合量测定

根据测试结果绘制肝素标准工作曲线(图8),经线性回归后得到的标准曲线方程为: $y=0.755\ 14-15x$, $R^2=0.999\ 1$,说明方程拟合较好,根据该方程,计算出CH中LMWH-CHO含量为23.7%。

3.5 CH活性测定

APTT和PT检测结果显示(表2),形成CH超

支化聚合物后APTT和PT均明显比LMWH长。LMWH在人血浆中质量浓度为 $150\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,CH聚合物的APTT和PT值分别为146 s、27.9 s,APTT比相同条件的LMWH延长了24.8%;PT比LMWH延长了近2倍。

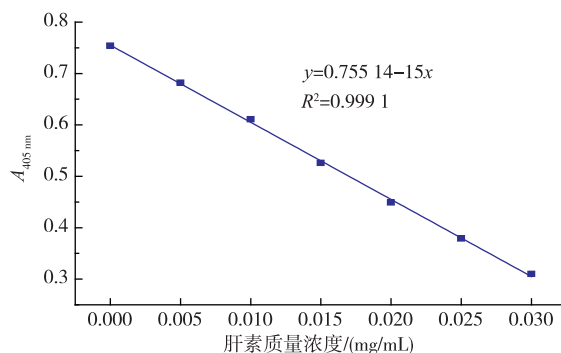


图8 肝素标准曲线

Fig. 8 Standard curve of Heparin

表2中 IC_{50} 是指样品对FXa和FIIa的半抑制浓度,即活性为50%时,所需要的样品浓度(nmol/mL)。 IC_{50} 值越大说明在抑制相同程度的FXa和FIIa时,所用的样品浓度越大,其抗凝血和抗血栓能力就越弱。从表2中可以看出,LMWH FXa IC_{50} 值最大,为514.21 nmol/L,形成超支化聚合物后,样品 IC_{50} 值为104.2 nmol/L,比LMWH降低了4.9倍。上述结果说明CH超支化聚合物的抗凝血活性较LMWH有显著提高。CH超支化聚合物对FIIa也有较强的抑制作用,其 IC_{50} 值为642 nmol/L,说明该聚合物有较好的抗血栓作用,而LMWH没有明显的抗血栓作用。

表2 肝素、LMWH及CH活性测定结果

Table 2 Results of biological activity of Heparin, LMWH and CH

样品	抗FXa $\text{IC}_{50}/(\text{nmol}/\text{L})$	抗FIIa $\text{IC}_{50}/(\text{nmol}/\text{L})$	APTT/s	PT/s
肝素	17.71	11.12	>180	84.2
CH	104.20	642	146	27.9
LMWH	514.21	>2000	117	14.8

4 结语

以CMC为骨链,以LMWH-CHO为支链,采用末端接枝的方法成功将LMWH-CHO缀合在CMC链上。在CMC- NH_2 和LMWH-CHO摩尔比为1:5的条件下反应12 h,可得到LMWH-CHO接枝率为23.7% CH超支化聚合物。 ^1H -NMR谱和紫外可见吸

收光谱证明了该 CH 超支化聚合物的分子结构与实验所设计的结构相符;研究结果表明,通过这种方法制备的超支化 LMWH 衍生物活性尽管不及普通

肝素,但远优于 LMWH。该方法具有制备过程简单,一步即可完成聚合反应,纯化操作简便可行。

参考文献:

- [1] 李涵,崔慧斐. 肝素在肿瘤治疗中的应用[J]. 生命的化学,2014(1):109-114.
LI Han, CUI Huifei. Application of heparin in cancer therapy[J]. **Chemistry of Life**, 2014, 34(1):109-114. (in Chinese)
- [2] WU M Y, HSU Y H, BAI C H, et al. Regional citrate versus heparin anticoagulation for continuous renal replacement therapy: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. **American Journal of Kidney Diseases**, 2012, 59(6):810-818.
- [3] RAN F, NIE S, LI J, et al. Heparin-like macromolecules for the modification of anticoagulant biomaterials [J]. **Macromolecular Bioscience**, 2012, 12(1):116-125.
- [4] OH Y I, SHENG G J, CHANG S K, et al. Tailored glycopolymers as anticoagulant heparin mimetics [J]. **Angewandte Chemie**, 2013, 125(45):12012-12015.
- [5] PAN J, QIAN Y, ZHOU X, et al. Oversulfated chondroitin sulfate is not the sole contaminant in heparin [J]. **Nature Biotechnology**, 2010, 28(3):203-207.
- [6] HIRSH J, WARKENTIN T E, RASCHKE R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety[J]. **CHEST**, 1998, 114:489S-510S.
- [7] 张苗, 刘文, 陈荆晓, 等. 还原响应型 K5 多糖胶束药物载体的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(1):34-39.
ZHANG Miao, LIU Wen, CHEN Jingxiao, et al. Preparation and properties of the redox-sensitive K5 polysaccharide micelles as drug carrier[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(1):34-39. (in Chinese)
- [8] PUYMIRAT E, AISSAOUI N, COLLET J P, et al. Comparison of bleeding complications and one-year survival of low molecular weight heparin versus unfractionated heparin for acute myocardial infarction in elderly patients. The FAST-MI registry [J]. **International Journal of Cardiology**, 2013, 166(1):106-110.
- [9] RHODES S, BOND S. A review of the practical advantages of low molecular weight heparin in the treatment of cancer-related venous thromboembolism[J]. **Eur J Oncol Nurs**, 2008, 12(5):425-429.
- [10] CHEN J H, JONES C L, LIU J. Using an enzymatic combinatorial approach to identify anticoagulant heparan sulfate structures[J]. **Chemistry & Biology**, 2007, 14(9):986-993.
- [11] 邓珊珊, 王明超, 曹琦琛, 等. 超支化聚合物新材料富集糖肽方法的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2014(8):67-73.
DENG Shanshan, WANG Mingchao, CAO Qichen, et al. Glycopeptides extraction using hyperpolymer-assisted hydrazide functionalized microsparticles[J]. **China Biotechnology**, 2014, 34(8):67-73. (in Chinese)
- [12] Schü ll C, Nuhn L, Mangold C, et al. Linear-hyperbranched graft-copolymers via grafting-to strategy based on hyperbranched dendron analogues and reactive ester polymers[J]. **Macromolecules**, 2012, 45(15):5901-5910.
- [13] Jikei M, Kakimoto MA. Hyperbranched polymers: a promising new class of materials[J]. **Progress in Polymer Science**, 2001, 26(8):1233-1285.
- [14] KIM Y H, WEBSTER O W. Water soluble hyperbranched polyphenylene: "a unimolecular micelle?" [J]. **Journal of the American Chemical Society**, 1990, 112(11):4592-4593.
- [15] 司甲清. 聚合物分子刷的制备及表征[D]. 湘潭:湘潭大学, 2011.
- [16] 易建建. 超支化聚酰胺的制备和表征以及性能的研究[D]. 北京:北京化工大学, 2010.
- [17] JEONG B, CHOI Y K, BAE Y H, et al. New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems [J]. **Journal of Controlled Release**, 1999, 62(1-2):109-114.
- [18] 万菁, 陈敬华. 肝素修饰金纳米粒子的制备及表征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(8):1521-1524.
WAN Jing, CHEN Jinghua. Preparation and characterization of heparin-modified gold nanoparticles [J]. **Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research**, 2009, 13(8):1521-1524. (in Chinese)