牛源肝素及其制备的低分子肝素的研究进展

杜 曦[1,2]，兰 舫[1,2*]，赵晓晓[1]，董艳丽[1]，李志敏[1,2]

（1. 河北常山生化药业股份有限公司，河北石家庄 050800；2. 河北省多糖类药物技术创新中心，河北石家庄 050800）

摘要：肝素作为抗凝药物在临床上广泛应用，其原料来源主要为猪肠黏膜。肝素钠事件和非洲猪瘟事件，一度导致猪源肝素供应短缺，因此 FDA 鼓励制造商增加其他种源肝素以降低单一种源的风险。文章以牛源肝素为研究对象，分析其与猪源肝素在相对分子质量、抗凝活性和化学结构（单糖、二糖、四糖）等方面的差异，同时综述了牛源肝素制备低分子肝素的研究进展。普通牛源肝素可直接用于临床，但由于抗凝活性较低，通常需要 2 倍于猪源肝素的剂量才能达到相同的抗凝效果。由于牛源肝素制备的低分子肝素与猪源低分子肝素在结构及抗凝活性等方面均存在显著差异，若要成药，可能需按新药标准注册。

关键词：牛源肝素；种属来源；抗凝活性；化学结构；低分子肝素；抗凝药物；研究进展

中图分类号：R973^{+}.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2025)11-1379-07

引用：杜 曦，兰 舫，赵晓晓，等. 牛源肝素及其制备的低分子肝素的研究进展[J]. 中国医药工业杂志，2025, **56**(11)：1379-1385. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.11.002

Research Progress on Bovine-derived Heparin and Low Molecular Weight Heparin Prepared Therefrom

DU Xi[1,2], LAN Fang[1,2*], ZHAO Xiaoxiao[1], DONG Yanli[1], LI Zhimin[1,2]

(*1. Hebei Changshan Biochemical Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050800; 2. Hebei Province Polysaccharide Drug Technology Innovation Center, Shijiazhuang 050800*)

ABSTRACT: Heparin is widely used clinically as an anticoagulant drug, with its main source being porcine intestinal mucosa. Due to the impacts of the heparin sodium incident and the African swine fever incident, a supply shortage of porcine-derived heparin was once caused. Therefore, the FDA encourages manufacturers to increase the supply of heparin from other sources to mitigate the risk associated with relying on a single source. This paper focuses on bovine-derived heparin, analyzing differences from porcine-derived heparin in relative molecular weight, anticoagulant activity, and chemical structure (including monosaccharides, disaccharides, and tetrasaccharides). And the research progress on the preparation of low molecular weight heparin (LMWH) from bovine-derived heparin is also reviewed. Unfractionated bovine heparin can be directly applied to clinical practice, but due to its lower anticoagulant activity, it requires approximately twice the dose of porcine heparin to achieve the same effect. There are significant differences in structure and anticoagulant activity between bovine LMWH and porcine LMWH. Thus, if bovine LMWH is to be developed as a drug, it may need to be registered in accordance with the standards for new drugs.

Key Words: bovine-derived heparin; species source; anticoagulant activity; chemical structure; low molecular weight heparin; anticoagulant drug; research progress

肝素及低分子肝素（low molecular weight heparin，LMWH）是临床上常用的抗凝血和溶血栓类药物[1]，还具有较强的抗炎、抗肿瘤、抗病毒、促进伤口愈合、抗贫血等药理特性[2—5]。肝素在使用过程中易与其他血清蛋白结合，引起骨质疏

收稿日期：2024-08-30

基金项目：河北石家庄市多糖类药物技术创新中心项目（No. 237790679A）、河北石家庄市中试熟化平台项目 (No.234200054A)

作者简介：杜 曦，硕士，工程师，从事肝素类抗凝药物的研究。

通信作者：兰 舫，硕士，工程师，从事低分子肝素类抗凝药物的研究。

松、血小板减少、出血等不良反应。与肝素相比，LMWH 具有更高的生物利用率、更长的半衰期和较小的不良反应。因而，LMWH 的临床用量已超过肝素，成为主要的抗凝血和溶血栓类药物。

肝素的制备原料通常来源于牛肺和猪肠等动物组织[6—7]。20 世纪 80 年代末，由于“疯牛病”的影响，大部分国家开始禁用牛源肝素类药物[8—9]。截至目前，USP 和 EP 等仍明确要求使用猪来源肝素来制备 LMWH[10]。然而，2018 年的非洲猪瘟事件造成肝素原料严重短缺，使人们意识到单一物种来源的潜在风险。当前，“疯牛病”已得到有效控制，且现有的纯化技术能有效清除肝素原料中的朊病毒杂质，牛源肝素重新被业界接受[7]。人们对牛源肝素及其低分子产品的理化指标和化学结构研究已较为深入。本文主要从相对分子质量、抗凝活性和化学结构（单糖、二糖、四糖）等方面，对比分析牛源肝素和猪源肝素的差异。此外，综述了牛源肝素制备 LMWH 的进展，并针对牛源肝素及其制得的 LMWH 抗凝活性较低的问题，列举了提高牛源肝素抗凝活性的方法，为重新引入牛源肝素及其 LMWH 提供有力支持。

1　肝素结构

肝素是一种线性黏多糖，由糖醛酸（uronic acid，UA）与葡糖胺（glucosamine，GlcN）通过 α-1,4- 糖苷键交替连接形成的二糖重复单元组成，其结构具备进行乙酰化、硫酸化及糖醛酸 C-5 位差向异构化修饰的位点[11—12]。糖醛酸 C-5 位的差向异构化可形成葡糖醛酸（glucuronic acid，GlcA）和艾杜糖醛酸（iduronic acid，IdoA）2 种构型，且其 C-2 位均可硫酸化形成 2-*O*- 硫酸化糖醛酸[1]。GlcN 的氨基位置可进行乙酰化或硫酸化修饰，C3 和 C6 位也可进行硫酸化修饰，形成 3-*O*- 硫酸化和 6-*O*- 硫酸化衍生物[1]。大多数肝素具有中等水平的硫酸化修饰（平均每个二糖单元有 2.5 个磺基），由完全硫酸化序列的长段［三硫酸化二糖（trisulfated disaccharide，TSD）结构域］、低硫酸化结构域（如二硫酸化二糖结构域）、抗凝血酶五糖序列等组成（图 1）[13]。其中，TSD 结构域在猪肠黏膜肝素中约占 70%，在牛肺肝素中约占 90%[14]。此外，少量的低硫酸化二糖和乙酰化二糖重复单元，在不同物种来源的肝素中所占的比例也不尽相同。这些因素就是导致猪、牛、羊来源肝素中的二糖成分存在差异的原因。

根据相关文献[15]报道，肝素分子的结构大体可分为两类：一类主要由 TSD 重复单元组成，会形成分子内规则区，与抗凝血酶Ⅲ（antithrombin Ⅲ，AT Ⅲ）的亲和力低；另一类含有五糖序列部分，可形成分子内不规则区，并含有一定量的 TSD 重复单元。肝素的抗凝活性主要来源于结构中的五糖序列，其核心位点为五糖序列中的 3-*O*- 磺酸基[16]。肝素的抗凝血因子Ⅹa（以下简称“Ⅹa”）活性主要来源于肝素核心五糖结构，而发挥抗凝血因子Ⅱa（以下简称“Ⅱa”）活性则还需要糖链长度大于 18 个糖单位[15]。

2　牛源肝素与猪源肝素的差异性分析

2.1　相对分子质量

牛源肝素的相对分子质量普遍低于猪源肝素[7]，且从不同组织、器官提取的牛源肝素具有不同的相对分子质量。其中，猪源肝素、牛肠肝素和牛肺肝素的重均分子量（M_w）分别约为 17 000、16 000、12 000[17]，可见牛肠肝素与猪源肝素较接近，而牛肺肝素则与猪源肝素差异明显。但值得注意的是，因检测方法

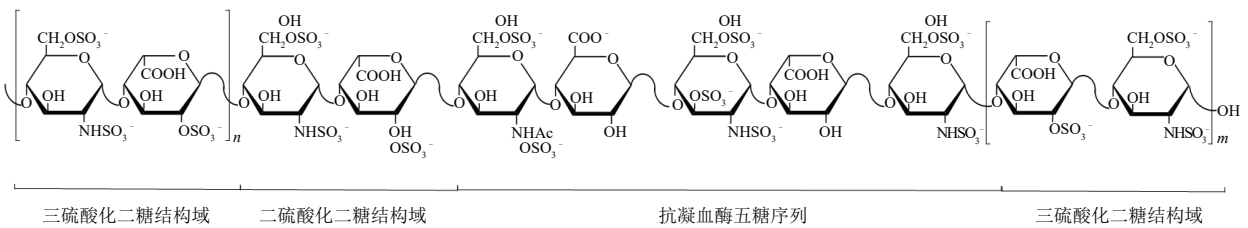


图 1　肝素的化学结构

Fig.1　Chemical Structure of Heparin

不同，测得的 M_w 结果也有一定差异，此时采用多分散性指数（polydispersity index，PDI）表征可能更为准确。有研究[18—20]表明，牛肠肝素的 PDI 值略低于猪肠肝素，牛肺肝素的 PDI 值要高于猪肠肝素。

2.2 抗凝活性

测定肝素类药物抗凝活性的方法通常为生色底物法、活化部分凝血活酶时间（activated partial thromboplastin time，APTT）法和血浆法。其中，生色底物法通过特定酶与底物的反应生成有色产物，再测定吸光度的变化来定量分析目标物质的活性或浓度，因此利用酶标仪就可比较肝素标准品与供试品的抗Ⅹa和抗Ⅱa活性，以评价供试品的效价。该法已被 ChP 2025 年版、EP 11 和 USP 48 等收录。APTT 法通过向血浆中加入激活剂和部分凝血活酶试剂来模拟内源性凝血途径，通过检测血浆凝固所需时间，确定凝血因子的活性。血浆法则是将加有肝素的血浆再钙化一定时间，观察其凝固程度，从而判定药物效价；但人为因素对其检测结果的影响较大，并且很难标准化。

牛源肝素和猪源肝素在效价方面存在很大差异。猪源肝素的抗凝活性至少为 180 IU/mg，且随着提取纯化技术的发展，普遍能达到 220 IU/mg；而牛肠肝素的效价活性通常低于 150 IU/mg，仅为猪源肝素的 30%～50%[19,21—22]。例如：JESKE 等[19]采用生色底物法测得牛肝素的抗Ⅱa活性为 133.0 IU/mg；GUAN 等[23]和 LIU 等[24]分别测得牛肝素的抗Ⅱa活性为 131 和 130.6 IU/mg。TOVAR 等[25]和 AQUINO 等[18]使用 APTT 法测得牛肠肝素的抗凝活性分别为 113.7 和（104±22）IU/mg。

猪源肝素的抗Ⅹa和抗Ⅱa效价基本一致（USP 48 中规定肝素钠抗Ⅹa与抗Ⅱa的效价比应为 0.9～1.1），但牛肠肝素抗Ⅹa与抗Ⅱa的效价比更低，即牛肠肝素拥有更高的抗Ⅱa因子活性[24]。

近年来的研究[18,26]表明，抗凝活性是牛源肝素与猪源肝素较显著的特征差异。为达到同等抗凝效果，牛源肝素的剂量需增至猪源肝素的 2 倍，这也造成其诱导出血等不良反应的风险是猪源肝素的 2 倍。

2.3 单糖结构

猪肠肝素主要由 TSD（→ 4-*α*-IdoA2S-1 → 4-*α*-GlcNS6S-1 →；其中，IdoA2S 代表 2-*O*- 硫酸化艾杜糖醛酸，GlcNS6S 代表 6- 硫酸化葡萄糖胺）重复单元组成。TOVAR 等[25]研究表明，牛肠肝素的氨基葡萄糖结构单元与猪肠肝素存在明显差异。除相似的 6- 和 *N*- 双硫酸化基团外，牛肠肝素还有约 36% 的 6- 脱硫酸化基团[18]。有研究[7,17]采用 ^{13}C NMR 分析了牛肠肝素和猪肠肝素，结果也显示牛肠肝素的 6-*O*- 脱硫酸化葡糖胺含量更高。

St ANGE 等[17]采用二维异核单量子相干谱（heteronuclear single quantum coherence spectroscopy，HSQC）法分析来源于猪肠、牛肠和牛肺的肝素，结果显示牛肠肝素图谱中化学位移 4.8-68、4.25-75、3.65-77、3.7-59 处的交叉峰比猪肠肝素或牛肺肝素图谱中的都宽，表明牛肠肝素具有更高的结构变异性。各信号的峰面积百分比积分结果表明，不同来源肝素的 3-*O*- 磺基基团含量也存在差异。这部分主要存在于 AT Ⅲ的五糖结合位点处，与肝素的抗凝活性相关。猪肠肝素中的 3-*O*- 磺基基团含量较高，其次是牛肺肝素，而牛肠肝素中的 3-*O*- 磺基基团含量较低[17]。MAURI 等[10]研究表明，牛肠黏膜、猪肠黏膜、羊肠黏膜、牛肺来源的肝素在单糖组成上有明显差异。其中，牛肠黏膜中的 GlcN6S 含量较低；GlcA 和 IdoA 在猪肠黏膜中含量较高，其次为羊肠黏膜，牛肺中含量较低。由于这些结构上的差异，利用核磁共振与统计学方法相结合的方式可分辨不同动物来源的肝素[27—28]。

2.4 二糖与四糖结构

牛源肝素与猪源肝素均含有 8 种常见的肝素二糖，但含量略有不同[27]。牛肠与猪肠肝素中的二糖 ΔIS（ΔUA2S-GlcNS6S）和 ΔIIIS（ΔUA2S-GlcNS）（化学结构如图 2 所示）的含量差异明显。相较于猪肠肝素，牛肠肝素中的 ΔIIIS 含量高（35% vs. 5%），而 ΔIS 含量低（45% vs. 60%）。通过这 2 组二糖含量的差异，利用主成分分析（principal component analysis，PCA），可检测出猪肠肝素中是否混入牛肠肝素（掺入 25% 以上）。这与核磁结果中牛源肝素

的 6-*O*- 脱硫酸化葡糖胺含量较高的结论一致。有研究 [29] 利用液相色谱 - 质谱联用多反应监测模式分析肝素的糖结构单元，结果显示三糖 ΔISH（ΔUA2S-GlcNS6S-HexA2S；其中，UA2S 代表 2-*O*- 硫酸化不饱和糖醛酸，HexA2S 代表 2- 硫酸化己烯糖醛酸）与二糖 ΔIA（ΔUA2S-GlcNAc6S）在不同来源肝素中的含量不同，牛源肝素中 ΔISH 和 ΔIA 的含量之比高于猪源肝素。利用该含量比，可鉴别掺入 5% 以上牛源肝素的猪源肝素。此外，研究 [30—31] 表明，由于牛源肝素的 ΔUA2S-GlcNS 的质谱特征峰强度显著高于猪源肝素，因此该质谱特征峰可用于辨别肝素的来源。虽与 TOVAR 等 [25] 研究得到的二糖组成不同，但结论一致。

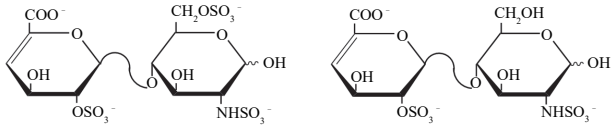


图 2　肝素中二糖 ΔIS（A）和 ΔIIIS（B）的化学结构

Fig.2　Chemical Structures of Disaccharides ΔIS（A）and ΔIIIS（B）in Heparin

欧阳艺兰 [27] 使用肝素酶 II 处理不同来源的肝素，得到了还原末端为 Glc3SNAc 和 GlcNS 的四糖。这些四糖与肝素的抗凝血活性密切相关 [16]。文献 [27] 采用 LC-MS 法在线分离并定量分析不同来源的肝素，结果显示猪源肝素中有 10 ～ 11 种四糖，而牛源肝素中的四糖多达 17 种，且不同来源肝素中四糖的种类及含量差别较大。将四糖的测定结果用统计学方法进行分析，可检测出猪源肝素中的其他种源肝素（掺入 10% 以上 [27]）。牛源肝素的酶解产物中存在多种不含乙酰基的较高硫酸化四糖；它们是来源于与 AT Ⅲ结合的五糖序列中含有 3-*O*- 硫基的四糖 ΔIIA-IISglu。这种四糖在猪肠肝素中的数量明显高于牛肺肝素，表明牛肺肝素包含的 AT Ⅲ结合位点少于猪肠肝素 [21]，此结构特征将导致牛肺肝素抗凝活性低于猪源肝素。

3　牛源 LMWH 的研究进展

虽然随着纯化技术的发展，肝素的纯度和临床安全性得到较大提升 [32—33]，但其在临床应用过程中仍会带来一些不良反应。1982 年 KAKKAR 等 [34] 首次报道了 LMWH 的临床研究结果：与肝素相比，LMWH 具有更高的生物利用率、更长的半衰期和较小的不良反应。LMWH 的临床用量已逐渐超过肝素，成为主要的抗凝血和溶血栓类药物。

3.1　牛源 LMWH

多数研究 [7,21,35—37] 表明用牛源肝素制备的 LMWH 抗凝活性较低，仅约为猪源肝素制品的 70%。但也有部分研究 [38—39] 采用牛源肝素制备牛源 LMWH，报道其抗凝活性亦符合 USP 48 要求（表 1）。de OLIVEIRA 等 [40] 通过纯化工艺分离了高抗凝牛肝素（high activity bovine heparin，HABH）和低抗凝牛肝素（low activity bovine heparin，LABH），并进一步将 HABH 制备为牛源 LMWH。抗凝活性试验结果显示，使用 HABH 可制备与猪源依诺肝素

表 1　牛肺和牛肠来源的 LMWH 分子量分布和抗凝活性

Tab.1　Molecular Weight Distribution and Anticoagulation Activity of Bovine Lung- and Bovine Intestinal-derived LMWH

样品	M_w	M_w<2 000 的片段分布量 /%	M_w 为 2 000 ～ 8 000 的片段分布量 /%	M_w>8 000 的片段分布量 /%	抗 X a 活性 /（IU·mg^{-1}）	抗 II a 活性 /（IU·mg^{-1}）	抗 X a 和抗 II a 活性的效价比
猪肠依诺肝素钠 [7]	4 435	15.9	73.0	11.1	102.5	25.3	4.1
牛肺 LMWH-1 [7]	4 651	14.6	71.8	13.6	75.6	18.1	4.2
牛肺 LMWH-2 [7]	4 538	15.2	72.5	12.3	76.9	19.0	4.0
牛肺 LMWH-3 [7]	4 623	14.3	71.4	14.3	76.6	18.5	4.1
牛肺 LMWH [38]	4 279	16.3	73.7	10.0	110.2	23.3	4.7
牛肺 LMWH [39]	4 560	17.3	71.7	11.0	106.3	25.8	4.1
牛肠 LMWH [35]	4 523	15.3	73.0	11.7	120.2	15.9	7.6
USP 标准	3 800 ～ 5 000	12.0 ～ 20.0	68.2 ～ 82.0	≤ 18.0	90.0 ～ 125.0	20.0 ～ 35.0	3.3 ～ 5.3

钠在相对分子质量、抗凝活性及 ^{1}H NMR 性质等方面相似的药物。

此外，牛源 LMWH 与猪源 LMWH 的二糖、四糖结构存在一定差异。牛肺 LMWH 中的二糖 ΔIS 含量较低，为 50%～58%，而猪肠依诺肝素钠中 ΔIS 含量为 58%～66%[38]；牛肠 LMWH 中的 Δ ⅢS 含量较高，但受产地影响较大，中国内地牛源的制品中的 Δ ⅢS 含量为 15%～24%，南美巴西牛源的制品中的 Δ ⅢS 含量为 24%～32%；猪肠依诺肝素钠中的 Δ ⅢS 含量仅为 5.8%～7.8%[35]。

由与 AT Ⅲ相互作用的核心五糖结构降解可得到 2 种四糖 ΔIIA-IVSglu 和 ΔIIA-IISglu。这 2 种四糖在牛肺 LMWH 样品中的含量要低于在猪肠依诺肝素钠中的含量[7]。此结构特征也能证明牛肺 LMWH 的抗凝血活性弱于猪肠依诺肝素钠。

研究[7]使用 ^{1}H NMR 法对比分析猪肠依诺肝素钠和牛肺 LMWH，结果显示牛肺 LMWH 中的乙酰基含量显著低于猪肠依诺肝素钠。再对其进行二维 NMR 分析，结果显示牛肺 LMWH 糖链的还原端 1,6-内醚糖单元主要为吡喃葡萄糖胺，而猪肠依诺肝素钠还原端的 1,6- 内醚糖单元组成中，1,6- 内醚吡喃葡萄糖胺与 1,6- 内醚吡喃甘露糖胺的含量基本相同。此外，2 种样品组成中的糖醛酸异构化也存在差异。其中，牛肺 LMWH 几乎全部由 IdoA 构成，未检测到 GlcA 糖单元；而猪肠依诺肝素钠中则含有少量 GlcA 糖单元。

3.2 提高牛源肝素抗凝活性的研究

目前报道的提高牛源肝素抗凝活性的方法主要有物理分离方法和酶修饰法。前者主要包括超滤膜分离[41]、琼脂糖凝胶亲和色谱分离[42]，以及依赖蔗糖密度梯度的离心分离[43]等；后者是利用磺酸基转移酶提高抗凝活性核心位点 3-*O*- 磺酸基团的含量来提高牛源肝素的抗凝活性[37,44]。

采用截留分子量 10 000 的超滤膜分离牛源肝素，可得到相对分子质量、抗凝作用不同的 2 种牛源肝素组分：中等相对分子质量（M_n=9 587）和较高相对分子质量（M_n=22 396）。二者抗凝活性分别为 103 和 154 IU/mg；而未分级的牛源肝素抗凝活性为 142 IU/mg，M_n=16 824[41]。由此可见，超滤得到的牛源肝素组分结构具有一定的差异，这将影响其抗凝血和溶血栓性能；由于构效关系尚不明确，具体影响需进一步研究。

通过琼脂糖凝胶亲和色谱可将肝素分离成高亲和力组分和低或无亲和力组分。2 种组分的抗凝活性差异较大，前者每 1 mg 抗凝活性约为 300 生物活性单位，而低亲和力组分的抗凝活性几乎为 0。除了电荷密度略有不同外，2 种肝素组分的初步表征未显示结构上的差异[42]。此外，通过依赖蔗糖密度梯度的离心方法也可以分离出 2 种组分，并且与亲和色谱法得到的肝素组分相似[43]。

使用 6-*O*- 磺酸基转移酶 -1/-3（6-OST-1/-3）和 / 或 3-*O*- 磺酸基转移酶（3-OST-1）酶修饰的方法可得到抗凝活性和相对分子质量符合 USP 中猪源肝素标准的重组牛源肝素[44]。适度增加牛源肝素中 3-*O*- 磺酸基团的含量可提高 AT Ⅲ结合位点的数量，使重组的牛源肝素抗凝活性接近猪源肝素，抗Ⅱa 效价可达 301 IU/mg[44]。BAYTAS 等[37]使用 3-OST-1 处理牛源肝素，得到的重组牛源肝素钠的抗凝活性可提高至 204 IU/mg。使用重组牛源肝素按照猪源依诺肝素钠的工艺路线制得牛源 LMWH，经多次试验后得到了分子量分布、1,6- 酐含量、抗Ⅹa 和抗Ⅱa 活性均符合 USP 要求的批次（表 2）。

虽然上述研究表明通过不同方法均可提高牛源

表 2 牛肠肝素制备的 LMWH 分子量分布和抗凝活性

Tab.2 Molecular Weight Distribution and Anticoagulant Activity of LMWH Prepared from Bovine Intestinal Heparin

样品	M_w	M_w<2 000 的片段分布量 /%	M_w 为 2 000～8 000 的片段分布量 /%	M_w>8 000 的片段分布量 /%	1,6- 酐含量 /%	抗Ⅹa 活性 /（IU·mg^{-1}）	抗Ⅱa 活性 /（IU·mg^{-1}）	抗Ⅹa 和抗Ⅱa 活性的效价比
依诺肝素钠	4 200	17	73	11	22	105	25	4.20
重组牛肠 LMWH[37]	4 700	14.5	69.5	16.1	17.7	107	29.3	3.65
USP 标准	3 800～5 000	12～20	68～82	≤18	15～25	90～125	20～35	3.3～5.5

LMWH 的抗凝活性，使其与猪源 LMWH 接近，但若要应用于临床，仍需要进一步研究。

4 总结与展望

本文主要从相对分子质量、抗凝活性和化学结构（单糖、二糖、四糖）等方面，汇总并分析了猪源肝素和牛源肝素的差异，同时综述了牛源与猪源肝素制备 LMWH 的研究进展。

牛源与猪源肝素在单糖、二糖和四糖结构上的差异，是导致牛源肝素抗凝活性低（约为猪源肝素的 70%）的主要原因。若要提高牛源肝素的抗凝活性，可以从结构差异出发，一是通过物理分离方法，将抗凝活性较高的组分提取出来；二是通过酶修饰法，提高抗凝活性核心位点的含量。由于牛源与猪源 LMWH 在结构及抗凝活性等方面的差异，若要成药，可能需按新药标准进行注册。目前，全世界的活牛总数量约为 10 亿头，其中中国、印度、巴西的数量较多（如中国的活牛数量约占全球的 15%）。如果能发展牛源肝素类药物，将会大幅减少中国畜牧板块的资源浪费，为肝素类药物生产提供巨大的市场储备空间，从根本上降低“肝素钠单一种源”对市场的影响。此外，全球有 50 多个穆斯林国家和地区，重新引入牛源肝素，将会填补肝素类药物在穆斯林市场的空白。随着市场需求的发展，拓展肝素类药物的种属来源已成必然趋势，牛源制品的引入也将为肝素类医疗行业提供坚实保障。

参考文献：

[1] 谢少帅. 亚硝酸降解法制备不同物种来源的低分子肝素[D]. 济南 : 山东大学硕士学位论文 , 2018.

[2] 陈茹茹 , 罗厚江 , 杨　军. 低分子量肝素作用机制及临床应用研究进展 [J]. 中国现代医生 , 2021, **59**(6): 182-186.

[3] 肖党生 , 方　辉 , 杨介钻 , 等. 探讨中西医结合防治新型冠状病毒肺炎 [J]. 中医临床研究 , 2021, **13**(36): 30-34.

[4] 王同生 , 苏秀丽 , 高鹏飞 , 等. 新型冠状病毒肺炎 : 高凝、血栓形成及抗凝 [J]. 实用医学杂志 , 2021, **37**(7): 835-838.

[5] 喻伟艳 , 许跃强 , 李建军 , 等. 新型冠状病毒的糖基化、糖受体识别及糖链抑制剂的发现 [J]. 生物工程学报 , 2022, **38**(9): 3157-3172.

[6] HOGWOOD J, MULLOY B, LEVER R *et al*. Pharmacology of heparin and related drugs: an update [J]. *Pharmacol Rev*, 2023, **75**(2): 328-379.

[7] 管玉东. 猪与牛来源肝素制备低分子肝素的比较研究 [D]. 济南 : 山东大学硕士学位论文 , 2016.

[8] NATHANSON N, WILESMITH J, GRIOT C. Bovine spongiform encephalopathy (BSE): causes and consequences of a common source epidemic [J]. *Am J Epidemiol*, 1997, **145**(11): 959-969.

[9] SHARMA O, CIVELLI VF, PETERSEN G. Porcine heparin shortages urge bovine heparin comeback: a literature review comparison of unfractionated heparin [J]. *Am J Epidemiol*, 2022, **29**(6): e764-e766.

[10] MAURI L, MARINOZZI M, PHATAK N, *et al*. 1D and 2D-HSQC NMR: two methods to distinguish and characterize heparin from different animal and tissue sources [J]. *Front Med* (Lausanne), 2019, **6**: 142.

[11] BAL DIT SOLLIER C, DILLINGER J G, DROUET L. Anticoagulant activity and pleiotropic effects of heparin [J]. *J Med Vasc*, 2020, **45**(3): 147-157.

[12] IQBAL Z, SADAF S. Commercial low molecular weight heparins — patent ecosystem and technology paradigm for quality characterization [J]. *J Pharm Innov*, 2023, **18**: 803-805.

[13] 张　彬. 猪和绵羊来源肝素寡糖结构的比较研究 [D]. 济南 : 山东大学硕士学位论文 , 2020.

[14] LANE D A. Heparin: chemical and biological properties, clinical applications [M]. London: Edward Arnold, 1989: 25-49.

[15] 石　峰 , 姬胜利 , 迟延青 , 等. 低分子肝素的制备方法及其结构与生物活性的关系 [J]. 中国生化药物杂志 , 2003, (2): 101-104.

[16] CHEN Y, ZHAO J, YU Y L, *et al*. Antithrombin Ⅲ -binding site analysis of low-molecular-weight heparin fractions [J]. *J Pharm Sci*, 2018, **107**(5): 1290-1295.

[17] St ANGE K, ONISHI A, FU L, *et al*. Analysis of heparins derived from bovine tissues and comparison to porcine intestinal heparins [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2016, **22**(6): 520-527.

[18] AQUINO R S, PEREIRA M S, VAIRO B C, *et al*. Heparins from porcine and bovine intestinal mucosa: are they similar drugs? [J]. *Thromb Haemost*, 2010, **103**(5): 1005-1015.

[19] JESKE W, KOUTA A, FAROOQUI A, *et al*. Bovine mucosal heparins are comparable to porcine mucosal heparin at USP potency adjusted levels [J]. *Front Med* (Lausanne), 2018, **5**:

360.

[20] TOVAR A M, SANTOS G R, CAPILLÉ N V, *et al*. Structural and haemostatic features of pharmaceutical heparins from different animal sources: challenges to define thresholds separating distinct drugs [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**(1): 35619.

[21] KRUPA E, HOPPENSTEADT D, JESKE W, *et al*. PB0570 A comparison of heparins from porcine and bovine origins in various laboratory assays [J]. *Res Pract Thromb Hae*, 2023. (DOI: 10. 1016/j. rpth. 2023. 100740.)

[22] ALCAZAR A J, IQBAL O, OLSON G, *et al*. PB0572 Potency-adjusted bovine heparin exhibits similar anticoagulant effects as porcine heparin in whole blood clotting studies [J]. *Res Pract Thromb Hae*, 2023. (DOI: 10. 1016/j. rpth. 2023. 100742.)

[23] GUAN Y, XU X, LIU X, *et al*. Comparison of low-molecular-weight heparins prepared from bovine lung heparin and porcine intestine heparin [J]. *J Pharm Sci*, 2016, **105**(6): 1843-1850.

[24] LIU X, ST ANGE K, FAREED J, *et al*. Comparison of low-molecular-weight heparins prepared from bovine heparins with enoxaparin [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017, **23**(6): 542-553.

[25] TOVAR A M, CAPILLÉ N V, SANTOS G R, *et al*. Heparin from bovine intestinal mucosa: glycans with multiple sulfation patterns and anticoagulant effects [J]. *Thromb Haemost*, 2012, **107**(5): 903-915.

[26] PAPINENI C, KRUPA E, IQBAL O, *et al*. PB0582 Differential neutralization of bovine heparins as measured by functional assays and absolute quantification of glycosaminoglycan context [J]. *Res Pract Thromb Hae*, 2023. (DOI: 10.1016/j. rpth. 2023. 100732.)

[27] 欧阳艺兰. 肝素分子量和组成分析方法开发及两种肝素物质的结构解析 [D]. 苏州 : 苏州大学博士学位论文 , 2019.

[28] COLOMBO E, MAURI L, MARINOZZI M, *et al*. NMR spectroscopy and chemometric models to detect a specific non-porcine ruminant contaminant in pharmaceutical heparin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, **214**: 114724.

[29] ZHANG B, SHI D, LI M, *et al*. A quantitative mass spectrometry method to differentiate bovine and ovine heparins from pharmaceutical porcine heparin [J]. *Carbohydr Polym*, 2023, **301**(Pt A): 120303.

[30] 刘晋仙 , 李玮涛 , 柳晓芳 , 等. 不同种属来源肝素组成与结构分析方法研究进展 [J]. 药学研究 , 2023, **42**(9): 719-723.

[31] 刘力波 , 田志鹏 , 李志敏. 牛源肝素钠的工艺研究与结构分析 [J]. 农产品加工 , 2023, (6): 77-80.

[32] BETT C, ANDREWS O, ASHER D M, *et al*. Eliminating spiked bovine spongiform encephalopathy agent activity from heparin [J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, **26**(10): 2478-2480.

[33] 赫普科技研究与发展有限公司. 安全的牛肝素、制备方法和应用 : 中国 , 113646336A [P]. 2021-11-12.

[34] KAKKAR V V, DJAZAERI B, FOK J, *et al*. Low-molecular-weight heparin and prevention of postoperative deep vein thrombosis [J]. *Br Med J* (Clin Res Ed), 1982, **284**(6313): 375-379.

[35] 金永生 , 靳彩娟 , 姚亦明. 一种牛肠粘膜依诺肝素钠及其制备方法与应用 : 中国 , 106467578 B [P]. 2019-05-10.

[36] XIE S, GUAN Y, ZHU P, *et al*. Preparation of low molecular weight heparins from bovine and ovine heparins using nitrous acid degradation [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, **197**: 83-91.

[37] BAYTAS S N, VARGHESE S S, JIN W, *et al*. Preparation of low molecular weight heparin from a remodeled bovine intestinal heparin [J]. *J Med Chem*, 2021, **64**(4): 2242-2253.

[38] 金永生 , 靳彩娟 , 姚亦明. 一种牛肺依诺肝素钠及其制备方法与应用 : 中国 , 106467577 B [P]. 2019-05-10.

[39] 汤庆刚 , 季春香 , 牛洪森 , 等. 一种清真依诺肝素钠及其生产纯化方法 : 中国 , 102585038 A [P]. 2012-07-18.

[40] de OLIVEIRA S, BEZERRA F, TOVAR A M F, *et al*. PB1087 An enoxaparin obtained from bovine heparin is equivalent to the original drug from porcine origin [J]. *Res Pract Thromb Hae*, 2023. (DOI: 10. 1016/j. rpth. 2023. 100848.)

[41] NOGUEIRA A V, DREHMER D L, IACOMINI M, *et al*. Biological and structural analyses of bovine heparin fractions of intermediate and high molecular weight [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, **157**: 72-78.

[42] HÖÖK M, BJÖRK I, HOPWOOD J, *et al*. Anticoagulant activity of heparin: separation of high-activity and low-activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin [J]. *FEBS Lett*, 1976, **66**(1): 90-93.

[43] LAM L H, SILBERT J E, ROSENBERG R D. The separation of active and inactive forms of heparin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976, **69**(2): 570-577.

[44] FU L, LI K, MORI D, *et al*. Enzymatic generation of highly anticoagulant bovine intestinal heparin [J]. *J Med Chem*, 2017, **60**(20): 8673-8679.