

胸腺五肽聚乳酸-羟基乙酸共聚物长效微球在大鼠体内的药动学研究

郝华珍*,王洪亮,刘玉玲[#](中国医学科学院药物研究所制剂室实验室,北京 100050)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)33-3100-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.33.09

摘要 目的:研究胸腺五肽(TP5)聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)长效微球(简称“TP5长效微球”)在大鼠体内的药动学特征。方法:取8只大鼠均分为普通注射液组(以TP5计1.5 mg/kg)和长效微球组(以TP5计40 mg/kg),单剂量肌肉注射相应的异硫氰酸荧光素标记TP5(FITC-TP5),以酶标仪测定普通注射液组(给药后0、5、10、15、30 min和1、2、4、6、10、24 h)和长效微球组(给药后0、0.5、1、2、4、10、24 h和4、7、14、21、28、35、42、49 d)大鼠体内FITC-TP5的荧光强度,计算血药浓度,采用DAS 2.0软件计算药动学参数和长效微球的累积释药情况。结果:普通注射液组和长效微球组大鼠体内FITC-TP5的药动学参数分别为 $t_{1/2}$:0.031、9.292 d, t_{max} :0.021、0.042 d, $MRT_{0-\infty}$:0.064、11.351 d, c_{max} :0.706、0.909 mg/L, $AUC_{0-\infty}$:0.078、2.554 mg·d/L;与普通注射液相比,长效微球中FITC-TP5的 $t_{1/2}$ 延长了299.7倍、 MRT 延长了177.3倍,缓释特征符合Higuchi方程,相对生物利用度为123%。结论:TP5长效微球可在大鼠体内缓慢释放,释药周期达42~49 d。

关键词 胸腺五肽;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;微球;荧光标记法;大鼠;药动学

Pharmacokinetic Study of Thymopentin PLGA Long-acting Microspheres in Rats

HAO Hua-zhen, WANG Hong-liang, LIU Yu-ling (Preparation Room, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the *in vivo* pharmacokinetic characteristics of thymopentin (TP5) PLGA long-acting microspheres (TP5 long-acting microspheres) in rats. METHODS: 8 rats were divided into TP5 injection group (TP5, 1.5 mg/kg) and long-acting microspheres group (TP5, 40 mg/kg). After TP5 labeled with single intramuscular injection of fluorescein isothiocyanate (FITC), the fluorescence intensity of FITC-TP5 in rats were determined in TP5 injection group (0, 5, 10, 15, 30 min and 1, 2, 4, 6, 10, 24 h after treatment) and long-acting microspheres group (0, 0.5, 1, 2, 4, 10, 24 h and 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 d after treatment). Blood concentration was calculated, and pharmacokinetic parameters and accumulative drug release of long-acting microspheres were calculated by using DAS 2.0 software. RESULTS: Pharmacokinetic parameters of TP5 injection group vs. long-acting microspheres group were as follows: $t_{1/2}$ 0.031 d vs. 9.292 d; t_{max} 0.021 d vs. 0.042 d; $MRT_{0-\infty}$ 0.064 d vs. 11.351 d; c_{max} 0.706 mg/L vs. 0.909 mg/L; $AUC_{0-\infty}$ 0.078 mg·d/L vs. 2.554 mg·d/L. Compared with TP5 injection group, in long-acting microspheres group, $t_{1/2}$ of FITC-TP5 extended by 299.7 times, and MRT extended by 177.3 times; the sustained release characteristics were in line with Higuchi equation, and relative bioavailability was 123%. CONCLUSIONS: TP5 long-acting microspheres show sustained release characteristics in rats with the release period of 42-49 days.

KEYWORDS Thymopentin; PLGA; Microspheres; Fluorescence labeling; Rats; Pharmacokinetic

胸腺五肽(Thymopentin, TP5)是一种人工合成的水溶性小分子多肽(Arg-Lys-Asp-Val-Tyr),具有双向免疫调节功能。目前用于临床治疗的剂型为注射用冻干粉,每日注射1次,疗程3~24个月,用药周期长、使用不便。为提高患者的用药依从性,众多学者对TP5的新型给药系统开展了广泛的研究。但由于TP5在人血浆中代谢极快,半衰期仅数十秒^[1-2],导致难以按照常规方法直接测定血药浓度,限制了新制剂的药动学和体内释药特征研究。如文献报道的口服TP5脂质体^[3]、口服TP5纳米粒^[4]和吸入TP5干粉吸入剂^[5]等均未对TP5的体内药动学进行直接考察,而是通过监测体内生物效应来间接反映体内吸收特征。本课题组前期采用复乳溶剂挥发法,成功制

备了体外缓释达1~2个月的TP5聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)长效微球(简称TP5长效微球),并采用残余微球药量法考察了微球体内的释药特征,但实验过程中发现,微球在注射部位的扩散使得组织切取范围难以界定,组织样品的匀浆处理也会影响肽类药物的稳定性。由于干扰因素多,使得该方法提取回收率低、重复性差,无法准确反映微球的体内释药特征。

异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记TP5(FITC-TP5)的方法,已成功用于TP5的吸入制剂和鼻腔给药制剂的体内分析^[6-7],但对于PLGA长效注射微球,因释药周期长、药物浓度低,目前尚未见FITC-TP5体内分析方法的应用报道。本实验针对微球体内药动学研究需求,建立FITC-TP5体内分析方法并进行系统的方法学验证,在此基础上将FITC-TP5与TP5按一定比例混合,采用复乳溶剂挥发法制备微球受试样品,考察大鼠单次肌肉注射后的体内药动学特征,

* 硕士研究生。研究方向:蛋白多肽类长效微球。电话:010-83160332。E-mail:haohuazhen@imm.ac.cn

[#] 通信作者:研究员,博士研究生导师。研究方向:蛋白多肽类长效微球。电话:010-63165232。E-mail:yliu@imm.ac.cn

由此计算不同时间的释药百分率并绘制体内释药曲线,拟合缓释动力学方程。本研究结果将为TP5长效微球的体内药动学研究和体内外相关性分析奠定体内分析的方法学基础,同时为后续的微球处方和工艺优化提供指导。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Epsilon 1-4冷冻干燥机(德国Christ公司);Mastersizer 2000激光粒度仪(英国Malvern公司);HITACHI S-4800扫描电镜(日本日立公司);SynergyHT酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 药品与试剂

TP5原料药(上海苏豪逸明制药有限公司,批号:1211096,纯度: $>97\%$);FITC-TP5原料药(上海辉源生物科技公司,批号:20130503,纯度: $>95\%$);TP5长效微球(中国医学科学院药物研究所自制,批号:20130522,载药量:16.4%);PLGA(美国Lactel公司,批号:A13-121);甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF级SD大鼠, δ ,体质量(190 ± 10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,使用许可证号:SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 FITC-TP5普通溶液。按照FITC-TP5:TP5=1:5的比例,以生理氯化钠溶液为溶剂,配制FITC-TP5和TP5的混合溶液,即FITC-TP5普通溶液,其中,FITC-TP5与TP5的质量浓度分别为0.05 mg/ml和0.25 mg/ml。

2.1.2 FITC-TP5长效微球混悬液。按照FITC-TP5:TP5=1:5的比例,将药物溶于纯净水中作为内水相,将PLGA溶于二氯甲烷与乙酸乙酯的混合有机溶剂中作为中油相,以0.5%聚乙烯醇(PVA)作为外水相,采用复乳溶剂挥发法,制备FITC-TP5长效微球,再以0.5%羧甲基纤维素钠混悬后制成混悬液。

2.2 FITC-TP5长效微球表征

2.2.1 形态与粒径。取FITC-TP5长效微球,采用扫描电镜观察其形态,激光粒度仪测定其粒径及分布。

2.2.2 载药量。取FITC-TP5长效微球,采用高效液相色谱法,色谱柱为Agilent C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相为pH 7.0磷酸盐缓冲液-甲醇(60:40),流速为1 ml/min,检测波长为230 nm,柱温为25 $^{\circ}$ C,进样量为20 μ l,依法测定,计算微球中FITC-TP5与TP5的载药量^[9]。

2.3 荧光标记体内分析方法研究

2.3.1 激发波长与发射波长。取一定浓度FITC-TP5溶液进行扫描得到激发波长和发射波长。

2.3.2 线性关系。采用大鼠空白血浆配制FITC-TP5质量浓度分别为0.003、0.03、0.3、0.6、3.0 μ g/ml的血浆样品,采用酶标仪测定各样品的荧光强度,以扣除空白后的荧光强度(y)对质量浓度(x)作线性回归。

2.3.3 日内精密性。照“2.3.2”项下方法配制FITC-TP5质量浓度分别为0.003、0.3、3.0 μ g/ml的血浆样品,各浓度日内平行测定5次,考察日内精密性。

2.3.4 回收率。照“2.3.2”项下方法配制FITC-TP5质量浓度分别为0.003、0.3、3.0 μ g/ml的血浆样品,测定荧光强度,代入回归方程计算含量,与加入量比较计算相对回收率。

2.3.5 样品稳定性。照“2.3.2”项下方法配制FITC-TP5质量浓度分别为0.003、0.3、3.0 μ g/ml的血浆样品,置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存,分别于配制后0、0.5、1、2、4、6 h测定各样品的荧光强度,考察其4 $^{\circ}$ C的稳定性。

2.4 体内释药特征

2.4.1 分组与给药。取大鼠8只,随机分为普通溶液组和长效微球组,每组4只。普通溶液组大鼠单剂量肌肉注射FITC-TP5普通溶液,按TP5总量计给药剂量为1.5 mg/kg;长效微球组大鼠单剂量肌肉注射FITC-TP5长效微球混悬液,按TP5总量计给药剂量为40 mg/kg。

2.4.2 检测方法。普通溶液组大鼠于给药后0、5、10、15、30 min和1、2、4、6、10、24 h,长效微球组大鼠于给药后0、0.5、1、2、4、10、24 h和4、7、14、21、28、35、42、49 d,分别眼眶静脉丛采血约0.3 ml,置于肝素化具塞离心管中,1 500 \times g离心10 min分离血浆,取100 μ l于96孔板中采用酶标仪测定其荧光强度,扣除空白荧光强度后代入回归方程计算FITC-TP5的浓度。

2.4.3 数据分析。分别绘制普通溶液组与长效微球组大鼠的药-时曲线,采用DAS 2.0药动学处理软件,对测定结果进行数据处理,计算主要药动学参数。以长效微球组大鼠的药-时曲线为基础,采用文献方法^[9],根据 $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty} \times 100\%$ 计算不同时间的释药百分率,绘制长效微球体内累积释药曲线,并进行缓释特征的动力学方程拟合。

3 结果

3.1 FITC-TP5长效微球表征结果

FITC-TP5长效微球呈橙色粉末状,流动性良好;扫描电镜照片可见微球呈圆整规则球形,表面光滑,不粘连;平均粒径为34.68 μ m,径距为1.123;总载药量为16.39%,其中FITC-TP5与TP5的载药量分别为3.04%、13.35%,与FITC-TP5:TP5=1:5的投料比例基本一致。FITC-TP5长效微球的扫描电镜图见图1。

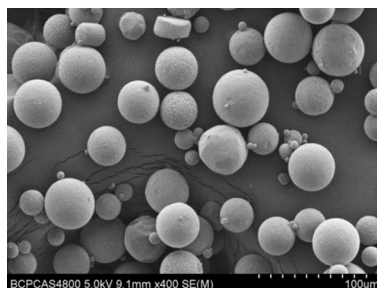


图1 FITC-TP5长效微球的扫描电镜图

Fig 1 SEM image of FITC-TP5 long-acting microspheres

3.2 体内分析方法研究结果

3.2.1 激发波长与发射波长。扫描得FITC-TP5的激发波长为480 nm,发射波长为520 nm。

3.2.2 回归方程与线性范围。回归方程为 $y=25\ 112x+6.196\ 2$ ($r=0.999\ 7, n=5$), FITC-TP5检测质量浓度的线性范围为0.003~3.0 μ g/ml。

3.2.3 日内精密性。0.003、0.3、3.0 μ g/ml血浆样品的日内RSD分别为19.04%、5.46%、7.30% ($n=5$),表明本方法符合体内药物分析要求。

3.2.4 回收率。0.003、0.3、3.0 μ g/ml血浆样品的回收率分别为(97.44 \pm 12.11)%、(100.89 \pm 8.43)%、(100.17 \pm 10.44)% , RSD分别为12.43%、8.36%、10.43% ($n=3$),表明本方法符合

体内药物分析的要求。

3.2.5 稳定性。0.003、0.3、3.0 μg/ml 血浆样品在 4 °C 保存 2 h 内的 RSD 均小于 20%，表明样品在 2 h 内质量稳定，可满足测定要求，具体结果见表 1。

表 1 稳定性试验结果 (n=3)

Tab 1 Results of stability tests (n=3)

c, μg/ml	t, h	RSD, %
0.003	0	11.94
	0.5	11.46
	1	13.54
	2	18.93
	4	20.20
	6	26.38
0.3	0	8.35
	0.5	7.11
	1	7.17
	2	7.24
	4	4.48
	6	11.20
3.0	0	10.43
	0.5	11.04
	1	9.48
	2	7.90
	4	4.88
	6	5.00

3.3 体内释药特征考察结果

3.3.1 药-时曲线。普通溶液组和长效微球组大鼠体内 FITC-TP5 的药-时曲线见图 2(右上角为 96 h 药-时曲线的局部放大图)。

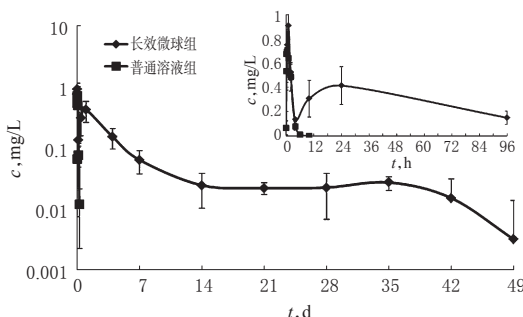


图 2 不同剂型 FITC-TP5 在大鼠体内的药-时曲线 (n=4)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of different dosage forms of FITC-TP5 in rats (n=4)

3.3.2 药动学参数。普通溶液组和长效微球组大鼠体内 FITC-TP5 的药动学参数见表 2。

表 2 不同剂型 FITC-TP5 在大鼠体内的药动学参数 (n=4)

Tab 2 The pharmacokinetic parameters of different dosage forms of FITC-TP5 in rats (n=4)

参数	普通溶液组	长效微球组
AUC _{0-t} , mg·d/L	0.077	2.508
AUC _{0-∞} , mg·d/L	0.078	2.554
MRT _{0-t} , d	0.063	10.425
MRT _{0-∞} , d	0.064	11.351
t _{1/2α} , d	0.031	9.292
t _{max} , d	0.021	0.042
c _{max} , mg/L	0.706	0.909

由图 2 和表 2 结果可看出，长效微球组大鼠给药剂量是普

通溶液组大鼠给药剂量的 26.7 倍，但 c_{max} 仅为 1.29 倍，同时其 t_{1/2} 延长 299.7 倍，MRT 延长 177.3 倍。通过计算，长效微球的相对生物利用度 F=AUC_{0-∞}(长效微球)/AUC_{0-∞}(普通溶液)×1.5/40×100%=123%。

3.3.3 微球体内释药曲线及释药动力学特征。以累积释药百分率(Q)为纵坐标、时间(t)为横坐标绘制体内释药曲线，见图 3。

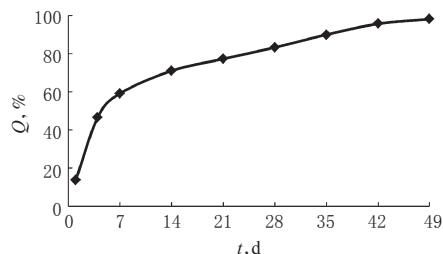


图 3 TP5 长效微球在大鼠体内的累积释放曲线

Fig 3 Accumulative release curves of TP5 long-acting microspheres in rats

分别运用 Higuchi、零级和一级数学模型，对 TP5 长效微球体内累积释放数据进行拟合。结果显示，0~49 d 的释放更符合 Higuchi 动力学特征 (r=0.959 9)。长效微球在 1~4 d 释放速率较快，4 d 内累积释放 46.71%，日均释药量约为 12%；4~7 d 释放逐渐减慢，日均释药量约为 4%；而 7~42 d 则按 1% 的日均释药量恒定释放，至 42 d 累积释放达 95.73%；49 d 时血浆中的 FITC-TP5 浓度已接近定量限。

4 讨论

FITC-TP5，系采用固相合成技术制备，序列为 FITC-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr，体外性质稳定、易溶于水，不影响 TP5 长效微球的制备。建立的 FITC-TP5 法，定量限为 0.003 μg/ml，回收率高、精密度好，能够满足微球体内分析的方法学要求，操作简便。

体内测定结果显示，TP5 普通溶液在体内快速消除，6 h 即测不到药物浓度，这可能与体内的快速代谢有关。与普通溶液比较，TP5 长效微球在注射部位可缓慢释放药物，使血浆中长时间维持一定的药物浓度，从而使药动学参数发生了显著改变，消除了药物浓度的峰谷波动，t_{1/2} 延长 299.7 倍，MRT 延长 177.3 倍。本实验的受试制剂 TP5 长效微球在大鼠体内的释放周期为 42~49 d，呈两相释药模式，即明显的快速释放期和其缓慢持续的释放过程。0~49 d 内的总体释药符合 Higuchi 动力学特征，49 d 时血浆中的 FITC-TP5 浓度已接近定量限。

对释药周期为 28~56 d 的微球，其临床使用剂量通常为普通注射液的 30~60 倍。本文考察的微球受试样品，早期虽有一定的突释效应，但峰浓度并未显著提高，这对于治疗窗宽、安全性好的 TP5，不会因此而产生安全隐患。另根据已有的研究，TP5 最初作用于机体后可产生一系列级联生物反应，从而发挥对慢性疾病治疗的药理活性^[10]。由此提示，用药早期可能需要有更高的药物浓度，后期只需维持在一定浓度即可。结合本文测得的 TP5 长效微球释药特征，推测其可能更有利于提高 TP5 的临床治疗效果。后期将开展微球的药理学研究和药动学/药理学相关性分析，进一步通过处方和工艺的优化，以期获得安全性好、有效性高、使用方便、28~56 d 给药 1 次的 TP5 微球制剂产品。

因 FITC-TP5 与 TP5 在体内的代谢与消除并不完全一致，因此采取 FITC-TP5 进行体内药动学研究，获得的某些药动学

利巴韦林对人肺腺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 Hela 迁移和凋亡的影响研究

郑来双^{1*}, 李 帅², 马玉莲¹(1.河南省医药采购服务中心, 郑州 450003; 2.河南省肿瘤医院, 郑州 450008)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)33-3103-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.33.10

摘要 目的:研究利巴韦林对人肺腺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 Hela 迁移和凋亡的影响。方法:以 A549、Hela 细胞为模型细胞,分别分为对照组和利巴韦林低、中、高剂量(20、40、80 $\mu\text{mol/ml}$)组,作用 24 h 后检测各组细胞的存活率、迁移能力、凋亡情况、酸性膜泡积累情况、自噬标志蛋白 LC3(以 LC3- II/LC3- I 为指标)的表达情况。结果:与对照组比较,利巴韦林能降低 A549、Hela 细胞的存活率(中、高剂量组差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)和迁移能力,增加 A549、Hela 细胞的凋亡率(低、中、高剂量组差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、酸性膜泡积累数量与剂量呈反相关, LC3- II/LC3- I 比值(中、高剂量组差异均有统计学意义, $P < 0.01$),作用与剂量呈正相关。结论:利巴韦林可能通过诱导细胞自噬降低 A549、Hela 细胞的迁移并诱导其凋亡。

关键词 利巴韦林;人肺腺癌细胞 A549;人乳腺癌细胞 Hela;迁移;凋亡

Effects of Ribavirin on the Migration and Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells and Human Breast Cancer Hela Cells

ZHENG Lai-shuang¹, LI Shuai², MA Yu-lian¹(1.Henan Medicine Procurement Service Center, Zhengzhou 450003, China; 2.Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of ribavirin on the migration and apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells and breast cancer Hela cells. METHODS: A549 cells and Hela cells were taken as model cells and divided into control group, ribavirin low-dose, medium-dose and high-dose groups (20, 40, 80 $\mu\text{mol/ml}$). The survival rate, migration ability, cell apoptosis, the accumulation of acid membranous vesicles, the expression of cell autophagy marker LC3 (LC3- II/LC3- I) were determined 24 h later. RESULTS: Compared with control group, ribavirin could decrease the survival rate (there was statistical significance of medium-dose and high-dose groups, $P < 0.05$ or $P < 0.01$) and migration ability of 549 cells and Hela cells; also could increase the apoptosis rate of them (there was statistical significance of low-dose, medium-dose and high-dose groups, $P < 0.05$ or $P < 0.01$), the number of acid membranous vesicles and LC3- II/LC3- I (there was statistical significance of medium-dose and high-dose, $P < 0.01$); the effects were positively associated with dosage. CONCLUSIONS: Ribavirin can reduce the migration and induce apoptosis of A549 and Hela cells by inducing cell autophagy.

KEYWORDS Ribavirin; Human lung adenocarcinoma A549 cells; Human breast cancer Hela cells; Migration; Apoptosis

参数与 TP5 本身可能有所差别,但这并不影响对微球体内释药动力学的比较研究与评价。

本文研究取得的结果不仅突破了 TP5 长效微球体内分析的限制,对于其他有类似代谢特点的蛋白多肽类药物的新型制剂药动学研究,同样也具有参考价值和借鉴意义。

参考文献

- [1] Audhya TK, Goldstein G. Thymopentin: stability considerations and potency by various routes of administration [J]. *Surv Immunol Res*, 1985, 4(Suppl 1):17.
- [2] Tischio JP, Patrick JE, Weintraub HS, et al. Short in vitro half-life of thymopentin 32-36 pentapeptide in human plasma[J]. *Int J Pept Protein Res*, 1979, 14(5):479.
- [3] 张宏.胸腺五肽脂质体的研究[D].天津:天津大学,2007:20-21.
- [4] He W, Jiang X, Zhang ZR. Preparation and evaluation of poly-butylcyanoacrylate nanoparticles for oral delivery of thymopentin[J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(6):2 250.

- [5] Gao J, Ding X, Chu C, et al. Dry powder inhalations containing thymopentin and its immunomodulating effects in Wistar rats[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 36(4/5):572.
- [6] Li YZ, Sun X, Gong T, et al. Inhalable microparticles as carriers for pulmonary delivery of thymopentin-loaded solid lipid nanoparticles[J]. *Pharm Res*, 2010, 27(9):1 977.
- [7] Wang J, Lu WL, Liang GW, et al. Pharmacokinetics, toxicity of nasal cilia and immunomodulating effects in Sprague-Dawley rats following intranasal delivery of thymopentin with or without absorption enhancers[J]. *Peptides*, 2006, 27(4):826.
- [8] 谢兰桂.胸腺五肽长效制剂的制备与评价[D].上海:复旦大学,2007:9-14.
- [9] Woo BH, Kostanski JW, Gebrekidan S, et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of 120-day poly(D, L-lactide) leuprolide microspheres[J]. *J Control Release*, 2001, 75(3):307.
- [10] 陈君,庞杰,张春彦,等.胸腺五肽配合治疗慢性阻塞性肺 38 例疗效观察[J].*中国民族民间医药杂志*, 2009, 2(1):95.

(收稿日期:2014-04-11 修回日期:2014-04-28)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0371-65960617。E-mail:2478793515@qq.com