文章编号:1000-5404(2011)17-1843-04

论著

人工合成胸腺素 α1 静脉注射后在小鼠和大鼠体内的分布与代谢

马建秀[1,2],李秀娟[3],臧凯宏[4],吴勇杰[2],高明堂[2],李文广[2] (730030 兰州,西北民族大学医学院机能教研室[1];730000 兰州,兰州大学基础医学院药理学研究所,甘肃省中药新药临床前研究重点实验室[2];730050 兰州,甘肃省中医院药剂科[3];730000 兰州,甘肃省中医学院药理教研室[4])

[摘要] **目的** 研究人工合成胸腺素 α1(synthetic thymosin alpha 1, sTα1)在小鼠和大鼠体内静脉注射的分布和排泄特点。**方法** 用竞争 ELISA 法测定 sTα1 在小鼠体内静脉注射后不同时间点组织中的药物浓度和不同时间段内尿液药物累计量;同法检测 sTα1 在大鼠体内静脉注射后不同时间段内胆汁药物累计量。**结果** 分布特点:小鼠 sTα1 静脉注射后 15 min 时胸腺中药物分布最高,浓度为(1 533.4 ± 712.4) ng/g,肝、脾、胸腺次之,在脑中含量较低;静脉注射后 30 min 时胸腺组织中药物分布依然最高,浓度为(25 583.4 ± 6 244.7) ng/g,脾、肾、肝中次之。sTα1 静脉注射后 1 h 时肾脏中药物分布最高,浓度为(6 164.1 ± 4 821.8) ng/g,胸腺浓度为(5 665.8 ± 3 881.9) ng/g。静脉注射后 2 h 时肾脏分布最高,浓度为(1 408.0 ± 1 252.7) ng/g,而胸腺中浓度仅为(306.4 ± 268.6) ng/g,其他组织中有少量分布,脑组织中的药物浓度接近血浆药物浓度,说明 sTα1 可通过血脑屏障。排泄特点:小鼠静脉注射 sTα1 1 mg/kg 后,12 h 尿累计排泄量为给药量的 26.35%,大鼠静脉注射 0.5 mg/kg sTα1 后,胆汁中未见有药物排出。**结论** 小鼠静脉注射 sTα1 后可以浓集于免疫器官胸腺和脾脏内,且可进入血脑屏障,以原型经肾排泄为主要排泄途径。

[关键词] 人工合成胸腺素;分布;排泄;ELISA;小鼠;大鼠
[中图法分类号] R977.1; R944.11; R969.1 [文献标志码] A

Distribution and excretion of synthetic thymosin α1 in mice and rats after intravenous injection

Ma Jianxiu[1,2], Li Xiujuan[3], Zang Kaihong[4], Wu Yongjie[2], Gao Mingtang[2], Li Wenguang[2] ([1]Department of Function, Medical College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu Province, 730030; [2]Key Lab of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, Institute of Phanmacy, College of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [3]Department of Pharmacy, Gansu Provincal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu Province, 730050; [4]Department of Pharmacy, Gansu Provincal College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the distribution and excretion of synthetic thymosin α1 (sTα1) in mice and rats after intravenous (i. v.) injection. **Methods** The sTα1 concentrations in tissues at different time points and cumulative amounts of sTα1 in urine over different periods after i. v. injection of sTα1 into mice were measured by competitive ELISA. The cumulative amounts of sTα1 in bile over different periods after i. v. injection of sTα1 into rats were also measured by competitive ELISA. **Results** The concentration of sTα1 in the thymus gland was the highest (1 533.4 ± 712.4 ng/g) at 15 min after i. v. injection of sTα1 (1 mg/kg) into mice, followed by those in the liver, spleen, and kidney, while sTα1 concentration in the brain was relatively low. At 30 min after i. v. injection of sTα1 into mice, sTα1 concentration in the thymus gland was still the highest (25 583.4 ± 6 244.7 ng/g), followed by those in the spleen, kidney, and liver. At 1 h after i. v. injection of sTα1 into mice, sTα1 concentration in the kidney was the highest (6 164.1 ± 4 821.8 ng/g), and that in the thymus gland was (5 665.8 ± 3 881.9) ng/g. At 2 h after i. v. injection of sTα1 into mice, sTα1 concentration in the kidney was the highest (1 408.0 ± 1 252.7 ng/g), and that in the thymus gland was (306.4 ± 268.6) ng/g, with trace amounts of sTα1 in the other tissues. The concentration of sTα1 in the brain was similar to that in blood plasma, indicating that sTα1 could pass through the blood-brain barrier. After i. v. injection of sTα1 (1 mg/kg) into mice, the cumulative amount of sTα1 in urine over 12 h was 26.35% of

[通信作者] 吴勇杰,E-mail:wuyj@lzu.edu.cn

administration dosage. There was no sTα1 excretion in bile after i. v. injection of sTα1 (0.5 mg/kg) into rats. **Conclusion** After i. v. injection of sTα1 into mice, sTα1 is mainly distributed in the thymus gland and spleen and primarily excreted through the kidney, and can pass through the blood-brain barrier.

[**Key words**] sTα1; distribution; excretion; ELISA; mice; rats

Corresponding author: Wu Yongjie, E-mail: wuyj@lzu.edu.cn

胸腺素α1(thymosin α1, Tα1)是氨基端乙酰化的28个氨基酸组成的多肽激素,相对分子质量为3 108,最初从小牛胸腺中提取纯化而成,1972年公布其氨基酸序列[1]。在过去十来年中,胸腺素在不同免疫抑制(肿瘤性或感染性疾病)条件下的生物学活性受到了广泛的关注。Tα1通过调节T淋巴细胞的功能,在免疫反应过程中起到重要作用,具有免疫刺激和直接的抗病毒作用,而且Tα1能辅助重建免疫缺陷患者的免疫功能。目前Tα1在临床上应用广泛,主要针对病毒感染性疾病及肿瘤,通过调节自身免疫功能进行辅助治疗[1-4]。迈普新是国产人工合成胸腺素,纯度好使用广泛。本研究利用人工合成胸腺素试剂盒,采用竞争酶联免疫法对其在小鼠体内的分布和代谢进行了全面的研究,旨在对Tα1在临床上合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

人工合成胸腺素(sTα1,商品名:迈普新)粉针剂,购自成都地奥九泓制药厂,规格:1.6 mg/瓶,生产批号:040322。人工合成胸腺素试剂盒(Thymosin α1 ELISA),购自德国Immundiagnostik AG公司。

1.2 仪器

EL_X800全自动酶标仪(美国BIO-TEC公司),TGL-16型低温离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 实验动物

昆明种小鼠,体质量19~28 g,雌雄兼用,由兰州大学实验动物中心提供,合格证号:医动字第14-005。

1.4 给药剂量和给药方式的确定

根据国家药监局化学药品非临床药代谢动力学研究的指导原则,分布和排泄实验采用一个药效学有效剂量,静脉给药方式[5]。

1.5 回收率及批内误差测定

以Thymosin α1 ELISA试剂盒中的稀释缓冲液分别将血清稀释5倍或10倍,sTα1以此稀释血清分别配制成1 000、250、64、16、4 μg/L,每个样品做4个平行孔,标准曲线以稀释缓冲液稀释的标准品作图,拟合回归方程,计算实测药物浓度,以实测药物浓度除以加入浓度,即为回收率。计算各浓度4孔吸光度的均值、标准差,求得*CV*,即批内误差。

1.6 sTα1的组织分布

小鼠48只,雌雄各半,按随机数据表分为4组,尾静脉内注射,sTα1 1 mg/kg为药效学有效剂量。于给药后15 min(分布相)、30 min(平衡相)、1 h(消除相1)、2 h(消除相2)眼眶采血。同时取心、肝、脾、肺、肾、脑、骨骼肌、胸腺及睾丸或子宫,称质量,取0.2~0.3 g,按1∶3(质量体积比,g/ml)在样品中加入生理盐水,剪碎,用玻璃匀浆器制备匀浆。所有血样4℃凝固,低温离心机8 000 r/min,10 min离心,分离血清,-20℃保存,检测前室温融化,稀释缓冲液稀释5倍或10倍,用ELISA法检测药物浓度。组织匀浆同法离心,分离上清于-20℃保存,余下处理方式同上。

1.7 sTα1在尿或胆汁中的排泄

1.7.1 尿排泄 小鼠50只,雌雄各半。尾静脉内注射,sTα1 1 mg/kg,注射前每鼠用1 ml生理盐水灌胃,每5只小鼠放入1个代谢笼内,分别于给药后的0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h分段收集尿液,将所收集的同笼中5只小鼠的尿液作为1个样品,记录各段尿液体积,-20℃保存,其余处理方法同上。

1.7.2 胆汁排泄 Wistar大鼠10只,体质量(250±25)g,雌雄不限,腹腔内注射戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉,开腹后胆总管插管,每鼠尾静脉内注射sTα1 1 mg/kg,分别于给药后0.5、1、2、4、8 h分段收集胆汁,记录各段胆汁体积,-20℃保存,其余处理方法同上。

1.8 竞争ELISA法检测样品

具体操作按Thymosin α1 ELISA试剂盒的操作手册进行。

1.9 数据处理及药代参数计算

得到的标准品数据用Cuver Expert软件四参数逻辑曲线绘制标准曲线,求得相应回归方程及统计参数;用Microsoft Excel 2003软件将样品吸光值代入标准曲线的回归方程计算出样品中药物浓度;用DAS软件进行曲线拟合并计算主要药代动力学参数。

2 结果

2.1 方法的灵敏度及样品回收率

Thymosin α1 ELISA试剂盒检测血清、组织匀浆、尿液及胆汁中的sTα1,最低检测灵敏度4 μg/L。sTα1在不同稀释倍数尿液、胆汁及肝组织匀浆上清液中的回收率及批内误差见表1~4。标准曲线见图1,四参数曲线方程为$y=(a+bx)/(1+cx+dx^2)$,$R^2\geq0.99$,error≤0.02。检测每一批次的样品时,标准品都采用与待测样品相同稀释倍数的血清、尿液、组织匀浆和胆汁进行稀释。因此,标准曲线未列出回归方程的参数值。每一块96孔板进行检测时都带有标准曲线,保证计算样品浓度所使用的参数值都是在同一实验条件下得出的,尽量减少检测和计算误差。

表1 sTα1在5倍稀释尿液中的回收率($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

实际加入sTα1(μg/L)	检测sTα1(μg/L)	回收率(%)	*CV*(%)
1 000	1 016.52±69.31	112.29±4.41	6.81
250	255.98±34.55	102.39±8.60	13.49
64	45.39±13.39	70.92±19.65	29.49
16	16.71±4.79	104.43±18.99	28.66
4	7.34±1.64	183.50±19.40	22.34

表2 sTα1在10倍稀释尿液中的回收率($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

实际加入sTα1(μg/L)	检测sTα1(μg/L)	回收率(%)	*CV*(%)
1 000	1 000.39±75.94	106.31±5.69	7.59
250	223.08±40.29	89.23±17.04	18.06
64	92.86±26.85	145.09±27.12	28.91
16	24.39±6.36	152.43±25.30	26.07
4	5.84±1.57	146.00±24.98	26.88

表3 sTα1在肝脏匀浆中的回收率($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

实际加入sTα1(μg/L)	检测sTα1(μg/L)	回收率(%)	*CV*(%)
1 000	978.88±41.02	97.84±3.71	4.19
250	216.31±29.80	86.52±10.09	11.92
64	69.79±9.58	109.64±12.03	13.72
16	20.05±3.64	124.09±20.61	18.15
4	6.21±1.03	149.75±18.56	16.58

表4 sTα1在胆汁中的回收率($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

实际加入sTα1(μg/L)	检测sTα1(μg/L)	回收率(%)	*CV*(%)
1 000	1 011.14±51.21	101.11±6.54	5.06
250	256.58±30.10	102.63±12.69	11.73
64	78.02±12.29	121.78±14.93	15.75
16	18.86±4.30	112.50±16.11	17.07
4	7.84±1.68	177.00±19.70	21.24

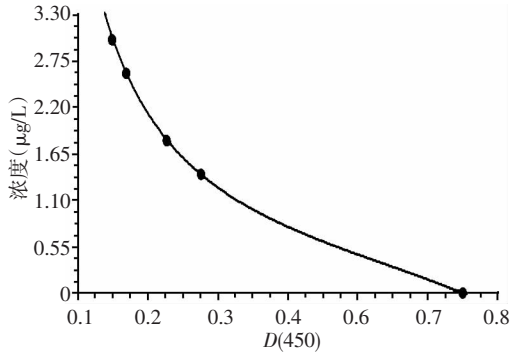


图1 sTα1标准曲线

2.2 小鼠体内的组织分布

小鼠sTα1静脉注射1 mg/kg后15 min时胸腺组织药物分布最高,肝、脾、肾次之,在脑中含量较低。sTα1静脉注射后30 min时胸腺组织中药物分布依然最高,脾、肾、肝中次之。sTα1静脉注射后1 h时肾脏中药物分布最高,胸腺次之。sTα1静脉注射后2 h时肾脏中药物分布依然最高,其他组织中只有少量分布。在sTα1静脉注射后30 min、1 h脑组织中检出药物浓度与血清药物浓度接近,表明sTα1可透过血脑屏障,2 h时脑组织中未检出药物。不同时间点在主要脏器和血清中的分布浓度比较见表5。

2.3 排泄

小鼠静脉注射1 mg/kg sTα1 24 h尿累计排泄量为给药量的26.35%,见表6。大鼠静脉注射0.5 mg/kg sTα1后,胆汁中没有检测到药物。

表6 1 mg/kg sTα1静脉注射后不同时间段在小鼠尿液中的累计量($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

时间段	排泄量(ng)	累计排泄率(%)
0.5 h	20 961.81±5 821.02	20.06
1 h	4 800.11±3 547.38	24.65
2 h	584.30±381.05	25.21
3 h	397.91±39.10	25.59
4 h	220.95±162.79	25.80
6 h	249.34±139.61	26.04
8 h	194.80±150.53	26.22
10 h	122.28±224.30	26.34
12 h	12.25±7.23	26.35

3 讨论

胸腺素作为有效的提高免疫功能的生物反应调节剂,在临床上应用广泛[1,6],其生物制品的本质决定了在研究药代动力学特征时与传统药物相比,具有种属特异性、免疫原性和非预期的多向性活性等特性,所选分析方法应能将进入体液的药物及其降解产物和代谢产物与内源性物质区别开来;应能排除许多因子如生物基质、基质内的蛋白水解、结合蛋白质以及其他许多

表5 sTα1静脉注射后不同时间在小鼠组织内的分布及与血清药物浓度的比较($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

脏器	15 min		30 min		1 h		2 h	
	浓度(ng/g)	与血清浓度的百分比(%)	浓度(ng/g)	与血清浓度的百分比(%)	浓度(ng/g)	与血清浓度的百分比(%)	浓度(ng/g)	与血清浓度的百分比(%)
血清	250.3±150.0	100.0	103.2±45.4	100.0	63.2±19.3	100.0	13.8±10.7	100.0
心脏	142.7±25.0	95.2	213.6±119.1	142.4	353.6±152.4	253.8	418.8±237.6	279.3
肝脏	1 094.8±718.2	730.1	1 066.1±1 115.6	710.9	684.9±627.6	456.7	643.4±265.2	429.0
脾脏	898.5±798.5	599.1	5 376.5±5 008.6	3 585.3	1 411.8±1 240.5	941.5	1 131.1±580.1	754.2
肺脏	323.4±128.7	217.0	390.5±83.6	260.4	603.1±553.4	402.2	626.2±239.3	417.6
肾脏	808.9±578.9	539.4	1 826.8±772.6	1 218.2	6 164.1±4 821.8	4 098.4	1 408.0±1 252.7	737.6
脑	85.5±7.0	57.1	388.2±133.3	258.9	243.7±143.0	162.5	203.8±124.6	135.9
肌肉	112.1±46.8	74.4	80.0±56.3	53.0	128.2±25.5	85.5	93.6±71.5	62.4
胸腺	1 533.4±712.4	1 022.5	25 583.4±6244.7	17 060.2	5 665.8±3 881.9	3 778.2	306.4±268.6	204.3
睾丸或子宫	18.6±11.7	12.4	0	0	0	0	0	0

干扰物可能产生的干扰。尽管 ELISA 法有一些诸如会受到大量的内源或外源性物质,如结合蛋白、代谢产物以及形成的抗体或混合物的干扰等缺点,但具有高灵敏度、高重复性、可自动化、非放射性、高效且适合批量测定等优点使其在生物制品的药代动力学研究中成为最常用的方法[7-9]。鉴于 sTα1 属于小分子多肽,常用的双抗体夹心 ELISA 法不适合小分子的检测会产生较大的误差,本实验采用基于竞争 ELISA 法的德国 Immundiagnostik AG 公司 Thymosin α1 ELISA 试剂盒。该试剂盒采用 Tα1 的单克隆抗体,特异性强,最低可检测到 4 μg/L,具有很高的灵敏度。为排除在各种干扰因素,我们分别考察了其在稀释血清、稀释尿液、组织匀浆及胆汁中的回收率,均大于 70%,符合生物制品临床前研究的要求,其中在不同稀释倍数血清中的回收率见本室已发表数据[10],但是低浓度 4 μg/L 的回收率最大达到 177%,可能是因为低浓度更容易受到体液本底水平的影响。由于 ELISA 法本身在检测上存在缺陷及低浓度回收率偏高等因素都会导致误差较高,为尽量避免误差的产生,在整个实验过程中,并未使用四参数完全相同的一个标准曲线,而是每一批次的样品都相对应于不同参数的标准曲线,相应标准品的稀释液也与待测样品一致。

一般情况下,生物技术药物在体内降解速度快,且分布容积较小,接近血浆,或血浆加细胞间隙的体积[11],但本研究中 sTα1 的分布容积并非具有这样典型的特征。sTα1 在小鼠体内的分布具有明显的靶器官选择性,在静脉注射后 15、30、60 min 和 120 min 4 个时间段检测到药物在胸腺的浓度是全身各个组织器官中最高的,其次是脾脏,并且在其中的分布浓度远远高于同时间点的血清药物浓度,表现出 sTα1 浓集于免疫器官的特点。肝脏中的药物浓度在 15 和 30 min 时几乎和脾脏是一样高,但随后在 1 h 和 2 h 时间点其中的药物浓度和心脏,肺脏这样一些血流丰富的组织相当,可能是静脉给药方式早期药物都要流经肝脏循环,所以初期有很高的浓度,后期药物浓度只与其血流量相关。而一些脂肪和结缔组织较多的脏器比如睾丸和子宫中药物浓度较低,只在给药后 15 min 时间点检测到少量存在。sTα1 可以可透过血脑屏障,但只有较低的浓度。肾脏的分布浓度也较其他组织为高,其后的排泄实验更加证实了这一点:小鼠静脉注射 sTα1 后 24 h 尿中原型药物的排泄量达到给药量的 26.35%,而在大鼠的胆汁中并未检测到,说明肾排泄是其主要排泄途径。对于人工合成胸腺素 sTα1 在动物体内分布的研究,仅见 1997 年 Badamchian 等[12]在小鼠体内的研究,此后对 sTα1 的分布排泄特征进行全面研究的文献少见。

本研究为 sTα1 在临床上进行更加合理的应用和其临床药理学研究提供了重要的参考数据。

参考文献:

[1] 马素永,许松山. 胸腺素 α1 的基础研究与应用现状[J]. 延边大学医学学报, 2009, 32(2): 145-148.

[2] Pierluigi B, D'Angelo C, Fallarino F, *et al*. Thymosin alpha1: the regulator of regulators? [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1194: 1-5.

[3] Garaci E, Pica F, Rasi G, *et al*. Thymosin alpha 1 in the treatment of cancer: from basic research to clinical application[J]. Int J Immunopharmacol, 2000, 22(12): 1067-1076.

[4] 杨霞, 钱锋, 刘凯军, 等. 胸腺肽 α1 体外刺激胃癌患者外周血单个核细胞对淋巴细胞亚群影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(12): 1249-1252.

[5] 化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局药品审评中心, 2005.

[6] 白建刚,饶红霞. 胸腺素 α1 临床应用进展[J]. 中外医疗, 2008(26): 130.

[7] 吴磊, 陈西敬. 生物技术药物的药代动力学研究近况[J]. 药学进展, 2008, 32(5): 201-207.

[8] Chen J H, Zhang X G, Jiang Y T, *et al*. Bioactivity and pharmacokinetics of two human serum albumin-thymosin alpha1-fusion proteins, rHSA-Talpha1 and rHSA-L-Talpha1, expressed in recombinant Pichia pastoris[J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(9): 1335-1345.

[9] 马国昌, 陈枢青, 朱振洪, 等. 酶联免疫吸附试验法研究 PEG-rhG-CSF 与 rHSA-hG-CSF 在小鼠体内的药代动力学[J]. 药学学报, 2007, 42(2): 197-200.

[10] 王莉, 缪苗苗, 覃红, 等. 人工合成胸腺素 α1 在猴体内静脉注射的药动学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(11): 1274-1278.

[11] 陈衍智, 李萍萍. 生物技术药物的药动学特点及研究方法[J]. 中国临床药学杂志, 2009, 18(1): 57-60.

[12] Badamchian M, Mora C A, Baumann C A, *et al*. Biodistribution of synthetic thymosin alpha1 in the serum, urine and major organs of mice[J]. Int J Immunopharmacol, 1997, 19(2): 59-66.

(**收稿**:2011-03-30;**修回**:2011-05-16)

(编辑 张 维)