

尖吻蝮蛇凝血酶在大鼠体内的药代动力学*

邓沁, 刘宏, 苏薇薇, 彭维, 吴忠, 王永刚, 姚宏亮
(中山大学生命科学学院//广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心,
广东 广州 510275)

摘要: 尖吻蝮蛇凝血酶是从尖吻蝮蛇蛇毒中分离纯化得到的一种类凝血酶, 是本团队研发的止血一类新药。采用¹²⁵I - 标记的放射性同位素法和三氯醋酸沉淀结合放射性检测法研究尖吻蝮蛇凝血酶在大鼠体内的药代动力学。结果表明两种方法测定的 AUC 值与剂量均呈正相关, 相关系数分别为 0.999 8 和 0.999 0; 肝、脾、心在给药后 5 min 药物含量最高, 其他绝大部分组织在给药后 30 min 药物含量最高, 以后逐渐降低; 在各时间点, 肝组织含药量显著高于其他组织; 此外, 尖吻蝮蛇凝血酶排泄较完全, 主要由尿排泄。

关键词: 尖吻蝮蛇凝血酶; 药代动力学; 大鼠

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529 - 6579 (2018) 01 - 0001 - 06

Pharmacokinetics of Haemocoagulase Acutus in rats

DENG Qin, LIU Hong, SU Weiwei, PENG Wei, WU Zhong, WANG Yonggang, YAO Hongliang
(Guangdong Engineering & Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-Evaluation
of Post-Market TCM, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Haemocoagulase Acutus (Halase), a new hemostatic in halase development, is a high-performance thrombin-like enzyme (TLE) derived from snake venom of *Agkistrodon acutus*. To study the pharmacokinetics of Halase, ¹²⁵I -labeled radioisotope method and radioassay combined with TCA precipitate were applied in rats. Results showed that AUC values were positively correlated with doses under both used methods, and the correlation coefficients were 0.999 8 and 0.999 0 respectively; drug concentration in liver, spleen and heart reached its peak after 5 minutes of administration while most of other organs reached it in 30 minutes, and then gradually decreased; in each time point, drug concentration in the liver was significantly higher than that in other tissues; Halase was completely excreted and mainly in urine.

Key words: Haemocoagulase Acutus; pharmacokinetics; rat

尖吻蝮蛇凝血酶 (Haemocoagulase Acutus, 简称为 Halase) 是本团队从尖吻蝮蛇蛇毒中分离纯化的一种类凝血酶, 研究表明其具有较强的止血作

用, 且无毒^[1-6]。本文采用¹²⁵I 标记的放射性同位素法 (RA)、三氯醋酸沉淀结合放射性检测法 (TCA - RA) 研究尖吻蝮蛇凝血酶在大鼠体内的药

* 收稿日期: 2017 - 07 - 21

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX09101 - 002 - 02); 广东省重大科技专项 (2011A080501004)

作者简介: 邓沁 (1988 年生), 女; 研究方向: 现代生物医药工程; E-mail: dengqin_tcm@126.com

通信作者: 姚宏亮 (1988 年生), 男; 研究方向: 创新药物的研究开发; E-mail: yhlsysu@126.com

代动力学, 为临床应用提供参考, 现报道如下。

1 材料

1.1 试剂与仪器

尖吻蝮蛇凝血酶, 实验室自制, 纯度大于 95%。三氯醋酸, 上海化学试剂采购供应站。生理盐水, 中国大冢制药有限公司。超纯水, 用日本密理博公司的纯水器制备。微机多探头 γ -计数器: 北京核仪器厂, 型号: FJ630G/12。

1.2 实验动物

Wistar 大鼠, 雌雄兼用, 体质量 200 g 左右, 由军事医学科学院四所动物实验中心提供, 动物生产合格证医动字第 005 号。

2 方法与结果

2.1 ^{125}I -Halase 的制备

标记: 采用氯胺 T 法进行尖吻蝮蛇凝血酶的 ^{125}I 标记。

纯化: 使用 Sephadex G50 凝胶柱分离纯化 ^{125}I 标记物, 收集 ^{125}I -Halase 测定放射比活性为 52.3 mCi/mg (1 935 MBq/mg), 质量浓度为 0.84 mCi/mL (31.1 MBq/mL), 放化纯度 >95%。制备 ^{125}I -Halase 色谱图见图 1。

生物活性: 测定 ^{125}I 标记后的尖吻蝮蛇凝血酶在标准血浆中的凝血时间, 以检验标记后的 Halase 生物活性。结果表明标记后不影响样品的生物活性。HPLC 分析也证明标记前后色谱行为未改变, 见图 2。

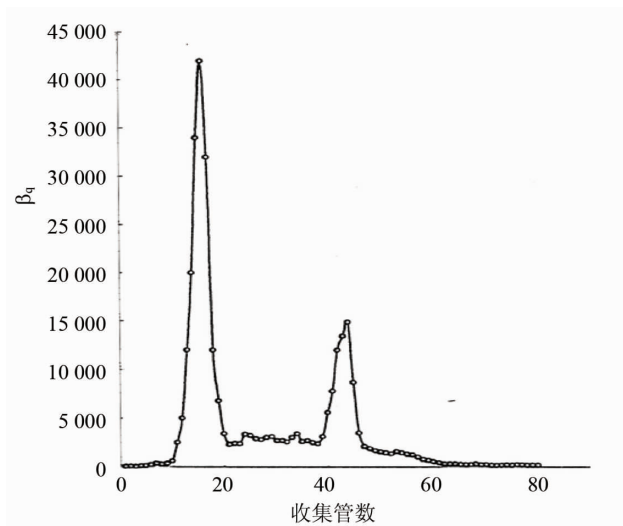


图 1 ^{125}I -Halase 色谱图

Fig. 1 ^{125}I -Halase chromatogram

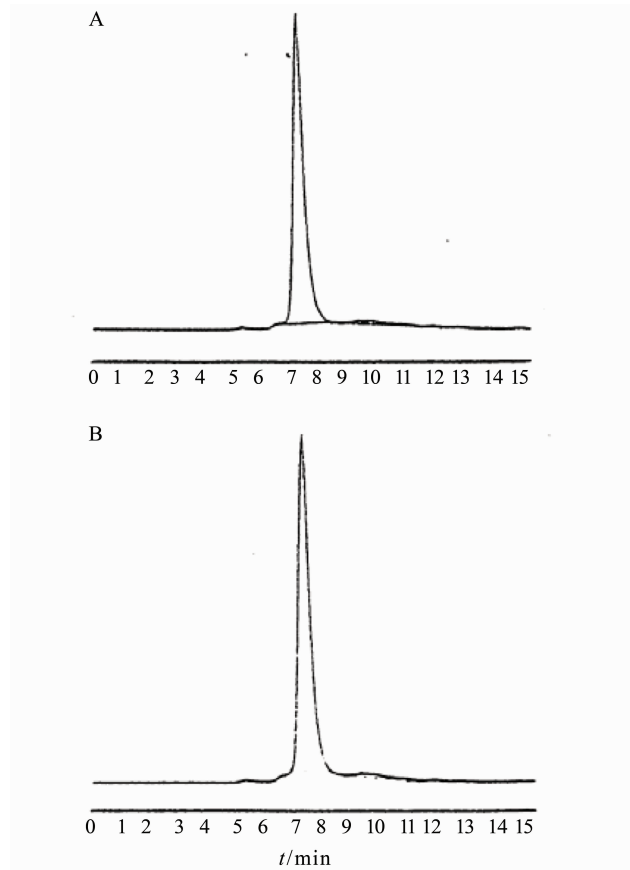


图 2 Halase 标记前后色谱比较

Fig. 2 Comparison between labeled Halase and unlabeled Halase

A: 标记前的 Halase 色谱图; B: 标记后的 Halase 色谱图

2.2 测定方法的建立和验证

2.2.1 标准曲线的制备 以质量浓度为 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的尖吻蝮蛇凝血酶 (含放射性 6.28 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) 配置标准液, 以生理盐水为溶剂, 配成质量浓度为 0.03、0.06、0.12、0.30、0.60、1.20、3.00 和 6.00 ng/mL 的标准液, 各取 200 μL 标准液置于测定管中, 在 γ -计数器上测定 1 min, 将质量浓度与计数值 (cpm) 绘成标准曲线, 标准曲线方程为: $Y = 25.8 + 5\,660.8X$ ($n = 8, r = 0.9999$)。

2.2.2 校正曲线的制备

(1) RA 法制备校正曲线: 按标准曲线的尖吻蝮蛇凝血酶质量浓度和相应的 ^{125}I -Halase 制备测定血清中尖吻蝮蛇凝血酶的校正曲线, 结果显示质量浓度与 cpm 呈直线相关, 校正曲线为: $Y = 56.3 + 5\,479.8X$ ($n = 8, r = 0.9999$)。质量浓度为 0.12、0.60、6.00 ng/mL 时, 从血清中用 RA 法直接测定尖吻蝮蛇凝血酶的回收率, 结果见表 1; 其日内、日间测定精密度结果见表 2; 本法最低能检测到 0.03 ng/mL 。

表 1 血清中¹²⁵I-Halase 的回收率 (Mean ± SD, n = 5)Table 1 Percent recovery of ¹²⁵I-Halase in serum (Mean ± SD, n = 5)

w / (ng · mL ⁻¹)	标准曲线/cpm	测定值/cpm	回收率 / %
0.12	652.7 ± 37.6	601.2 ± 39.4	92.1
0.60	3 410.3 ± 175.0	3 391.0 ± 192.9	99.4
6.00	33 848.3 ± 376.5	32 718.4 ± 469.0	96.7

表 2 血清中¹²⁵I-Halase 的测定精密度 (Mean ± SD, n = 5)Table 2 Precision of ¹²⁵I-Halase in serum (Mean ± SD, n = 5)

w / (ng · mL ⁻¹)	日内测定值	相对标准差 RSD / %	日间测定值	相对标准差 RSD / %
0.12	0.11 ± 0.01	6.25	0.11 ± 0.01	5.93
0.60	0.61 ± 0.01	5.78	0.60 ± 0.05	8.11
6.00	5.96 ± 0.09	1.44	5.84 ± 0.07	1.14

同法制备测定心、脑、肝、肾、肌肉组织中¹²⁵I-Halase的校正曲线, 以及尿、粪、胆汁的校正曲线, 结果分别为: 心: $Y = 12.5 + 5 526.0 X (n=8, r=0.999 9)$; 肝: $Y = 98.3 + 5 225.3 X (n=8, r=0.999 5)$; 肾: $Y = 61.4 + 5 350.1 X (n=8, r=0.999 7)$; 脑: $Y = 13.3 + 5 542.5 X (n=8, r=0.999 7)$; 肌肉: $Y = 68.5 + 5 338.8 X (n=8, r=0.999 9)$; 尿: $Y = 219.8 + 4 915.1 X (n=8, r=0.999 5)$; 粪: $Y = 138.0 + 4 882.7 X (n=8, r=0.999 9)$; 胆汁: $Y = 17.6 + 5 653.4 X (n=8, r=0.999 9)$ 。

(2) TCA-RA 法制备血清校正曲线: 按上述血清 RA 法校正曲线的制作方法, 然后每管各加入 $\varphi = 20\%$ 三氯醋酸 (TCA) 0.2 mL, 振荡, 离心 (3 000 r/min, 10 min), 弃去上清液, 测定沉淀物中尖吻蝮蛇凝血酶的含量, 结果表明浓度与 cpm 呈直线相关, 校正曲线为: $A = 24.7 + 4 197.7 C (n=8, r=0.999 8)$ 。

同法制备测定心、脑、肝、肾、肌肉三氯醋酸沉淀物中¹²⁵I-Halase的校正曲线, 结果分别为: 心: $A = 43.5 + 3 892.3 C (n=8, r=0.999 8)$; 肝: $A = 97.2 + 3 758.2 C (n=8, r=0.999 3)$; 肾: $A = 70.8 + 3 811.1 C (n=8, r=0.999 5)$; 脑: $A = 45.4 + 3 994.0 C (n=8, r=0.999 3)$; 肌肉: $A = 86.1 + 3 969.4 C (n=8, r=0.999 4)$ 。

2.3 大鼠静脉给药三剂量的药代动力学研究

2.3.1 RA 法

(1) 总放射性浓度: 本试验根据药效试验所用剂量, 在安全、有效的剂量范围内, 设计了大鼠静脉给药尖吻蝮蛇凝血酶 0.6、1.2 和 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$

3 个剂量组, 每 100 g 体重给药体积为 0.5 mL, 每 100 g 体重含¹²⁵I-Halase 3.142 μCi 。给药后 2、5、15、30 min, 1、2、3、4、6、8、12、24、36 和 48 h 采血, 分离出血清, 2~30 min 各取 100 μL 血清置于测定管中, 1~48 h 各取 200 μL 血清置于测定管中, 测定 1 min 的放射性。每一时间点 6 只大鼠, 3 雌 3 雄。三剂量血药质量浓度-时间变化趋势比较见图 3。

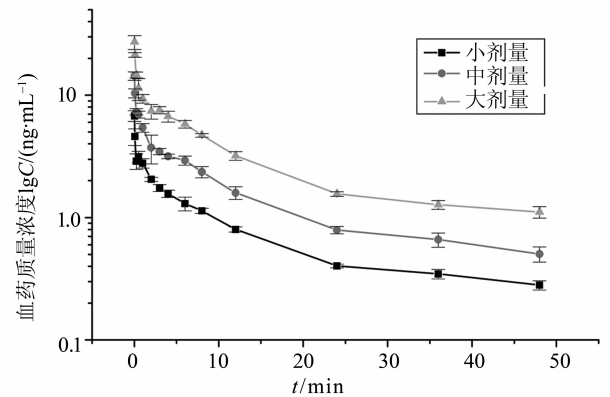


图 3 用 RA 法测得的三剂量的血药质量浓度-时间曲线比较 (Mean ± SD, n = 6)

Fig. 3 Comparison of plasma concentration-time curves of three doses using RA method (Mean ± SD, n = 6)

(2) 药代参数: 将实验数据用中国药理学学会数学药理专业委员会的 3P97 实用药代动力学计算程序自动拟合 $c-t$ 曲线, 计算所得药代动力学参数结果见表 3。用 RA 法所测得的 iv 血清中总放射性的消除半衰期 $t_{1/2\beta}$ 8~10 h, AUC 与剂量呈正相关, r 为 0.999 8。

表 3 由总放射性测定求得的尖吻蝮蛇凝血酶的药代参数

Table 3 Pharmacokinetic parameters of Halase calculated by total radioactivity

参数	单位	iv/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)		
		0.6	1.2	2.4
A	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	6.06	9.41	19.89
α	h^{-1}	11.44	3.24	4.27
B	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.49	4.44	8.59
β	h^{-1}	0.082	0.071	0.064
Vc	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.070	0.087	0.084
$T_{1/2\alpha}$	h	0.06	0.21	0.16
$T_{1/2\beta}$	h	8.50	9.74	10.87
K_{21}	h^{-1}	3.391 0	1.086 4	1.331 0
K_{10}	h^{-1}	0.275 2	0.212 2	0.204 3
K_{12}	h^{-1}	7.860 1	2.012 4	2.794 6
AUC	$\text{ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$	31.06	65.28	139.39
CL	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0.019	0.018	0.017

2.3.2 TCA-RA 法

(1) 血清中尖吻蝮蛇凝血酶质量浓度: 本试验设计方案与总放射性测定方案相同, 给药剂量与采血时间均同上, 采血后取血清 200 μL , 加等量的 $\varphi = 20\%$ 三氯醋酸, 振荡, 3 000 r/min, 离心 10 min, 移走上清液, 测定 1 min 沉淀物中的放射性。计算出尖吻蝮蛇凝血酶的质量浓度, 每一时间点测定 6 只大鼠, 3 雌 3 雄。三剂量血药浓度 - 时间变化趋势比较见图 4。结果可见各时间点的尖吻蝮蛇凝血酶质量浓度与剂量相关, 质量浓度比总放射性低, 消除也比总放射性快。

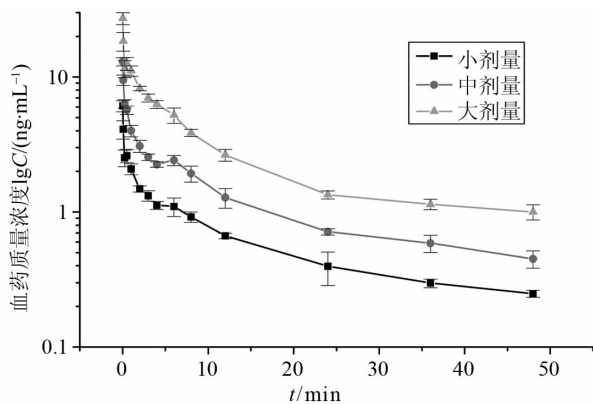


图 4 用 TCA-RA 法测得的三剂量的

血药质量浓度 - 时间曲线比较 (Mean \pm SD, $n = 6$)Fig. 4 Comparison of plasma concentration-time curves of three doses using TCA-RA method (Mean \pm SD, $n = 6$)

(2) 药代参数: 将实验数据用中国药理学学会数学药理专业委员会的 3P97 实用药代动力学计算

程序自动拟合 $c-t$ 曲线, 计算所得药代动力学参数结果见表 4。用 TCA-RA 法所测得的 iv 血清沉淀物放射性的消除半衰期 $t_{1/2\beta} 5 \sim 6$ h, AUC 与剂量呈正相关, r 为 0.999 0。

表 4 由血清沉淀物含量求得的

尖吻蝮蛇凝血酶的药代参数

Table 4 Pharmacokinetic parameters of Halase calculated by serum sediments

参数	单位	iv/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)		
		0.6	1.2	2.4
A	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	6.02	9.91	25.90
α	h^{-1}	14.57	6.15	14.33
B	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.37	4.36	10.88
β	h^{-1}	0.137	0.112	0.110
Vc	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.071	0.084	0.065
$T_{1/2\alpha}$	h	0.048	0.113	0.048
$T_{1/2\beta}$	h	5.07	6.19	6.28
K_{21}	h^{-1}	4.212 5	1.954 1	4.319 0
K_{10}	h^{-1}	0.473 2	0.352 3	0.366 4
K_{12}	h^{-1}	10.023 2	3.951 4	9.759 0
AUC	$\text{ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$	17.74	40.50	100.38
CL	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0.034	0.030	0.024

2.4 组织分布试验

2.4.1 RA 法测定的总放射性的分布 大鼠静脉注射尖吻蝮蛇凝血酶 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (每 100 g 体质量给药体积为 0.5 mL, 每 100 g 体质量含 ^{125}I -Halase 3.142 μCi), 给药后 5 min、30 min、2 h、8 h 和 24 h 处死动物, 取全血、脑、心、肺、肝、脾、肾、胃、小肠、肌肉、脂肪、卵巢、子宫和睾丸, 每一组织脏器用水按 1:5 的比例制成匀浆, 取 0.4 mL 进行总放射性测定, 再根据校正曲线计算出各组织的放射活性含量; 每一时间点取样 6 只动物, 雌雄各半。结果见图 5, 从结果来看: 肝、脾和心在给药后 5 min 药物含量最高, 其他绝大部分组织在给药后 30 min 药物含量最高, 以后逐渐降低; 在各时间点, 放射活性以肝组织含药量显著高于其他组织, 脾、肺、肾、胃、心等组织含药量较高, 脑、脂肪组织含量最低, 除肝脏外各组织含药量都小于同期的血药含量。

2.4.2 TCA-RA 法测定的尖吻蝮蛇凝血酶分布

在上述试验的基础上, 对组织脏器进行了尖吻蝮蛇凝血酶原型药物的测定。取上述实验所得组织匀浆 400 μL , 加 TCA 400 μL , 振荡, 3 000 r/min 离心 10 min, 移走上清液, 沉淀物进行放射性测定。求得组织中尖吻蝮蛇凝血酶含量。试验结果见图 6 所

列，从结果来看：肝、脾和心在给药后 5 min 药物含量最高，其他绝大部分组织在给药后 30 min 药物含量最高，以后逐渐降低；在各时间点，放射活

性以肝组织含药量显著高于其他组织，脾、肺、肾、胃、心等组织含药量较高，脑、脂肪组织含量最低。此法与 RA 法所得结果一致。

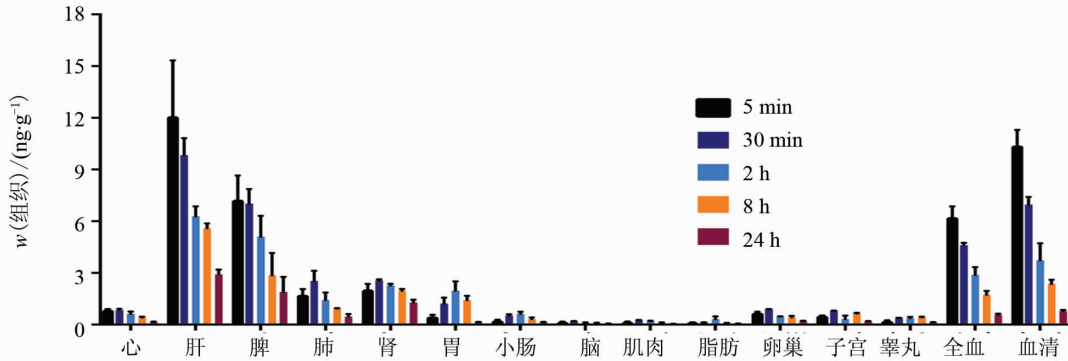


图 5 大鼠静脉注射 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 尖吻蝮蛇凝血酶后用 RA 法测得的组织分布

Fig. 5 Tissue distribution detected by RA method in rats injected with 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Halase (i. v.)

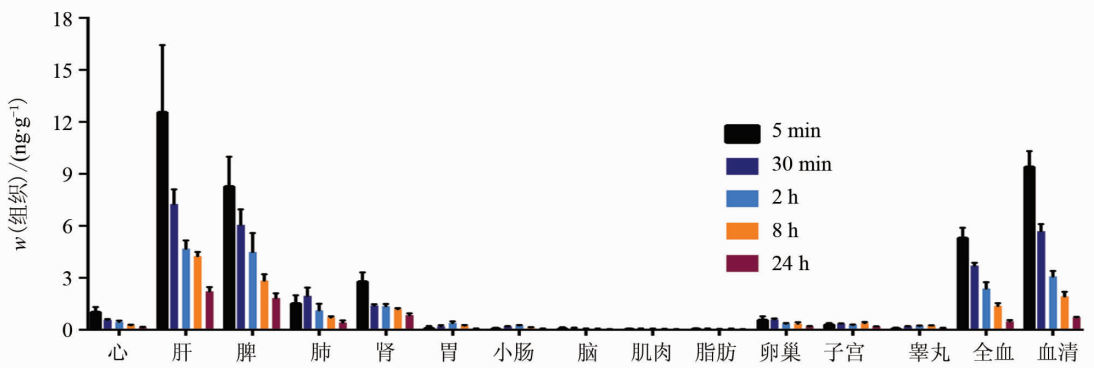


图 6 大鼠静脉注射 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 尖吻蝮蛇凝血酶后用 TCA-RA 法测得的组织分布

Fig. 6 Tissue distribution detected by TCA-RA method in rats injected with 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Halase (i. v.)

2.5 排泄试验

2.5.1 尿排泄 Wistar 大鼠，雌雄各 4 只，静脉给药尖吻蝮蛇凝血酶 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （每 100 g 体重给药体积为 0.5 mL，每 100 g 体重含 ^{125}I -Halase 3.142 μCi ）后放入代谢笼内，收集给药后 0~2、2~4、4~6、6~8、8~12、12~24、24~36、36~48、48~72、72~96 h 的尿样和粪样，尿样稀释并计量，粪样用水制成匀浆后计量。取一定量的尿样置于测定管内，用 γ -计数器测定 1 min 放射性，见图 7。从尿累计排泄量来看，给药后 96 h 内由尿排出的放射量约占给药剂量的 73.52%，表明该药主要是由尿排泄。

2.5.2 粪排泄 在尿排泄试验收集到的粪样，制成匀浆后，取一定量的粪样置于测定管内，用 γ -计数器测定 1 min 放射性，结果见图 8，在 96 h 内粪累计排泄量占所给药剂量的 12.13%。

2.5.3 胆汁排泄 Wistar 大鼠 6 只，雌雄兼用，体质量 200 g 左右。乌拉坦（1.2 g/kg, ip）麻醉

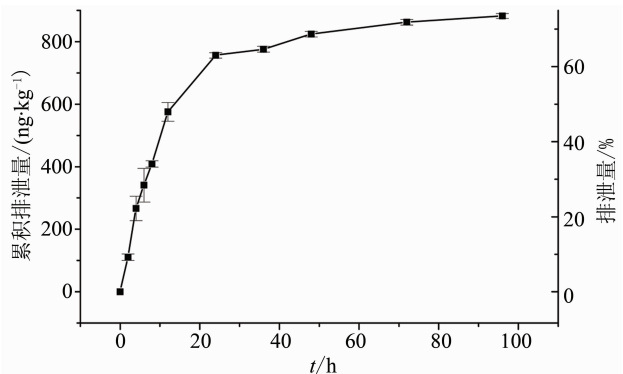


图 7 大鼠静脉注射 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 尖吻蝮蛇凝血酶后尿排泄曲线

Fig. 7 Urinary excretion curve of rats injected with 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Halase (i. v.)

后,胆管插管,iv 给药 Halase $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}$, 收集给药后 0~2、2~4、4~6、6~8、8~12 和 12~24 h 的胆汁,稀释后计量。取 0.2 mL 胆汁置于测定管内,用 γ -计数器测定 1 min 放射活性,结果见图 9。给药后 24 h 内由胆汁排出的药量占给药剂量的 4.16%。

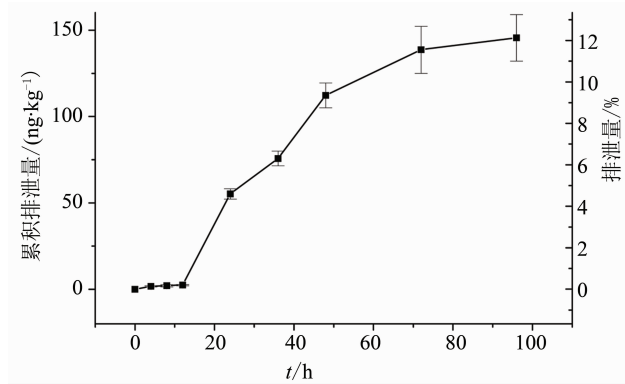


图 8 大鼠静脉注射 $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 尖吻蝮蛇凝血酶后粪排泄曲线

Fig. 8 Fecal excretion curve of rats injected with $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ Halase (i. v.)

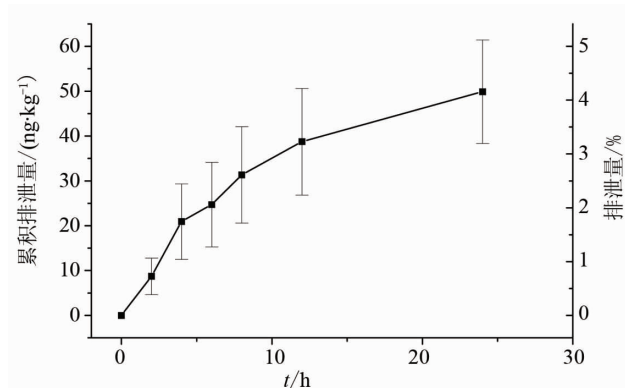


图 9 大鼠静脉注射 $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 尖吻蝮蛇凝血酶后胆汁排泄曲线

Fig. 9 Bile excretion curve of rats injected with $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ Halase (i. v.)

3 讨论

应用放射性同位素法进行药代动力学研究时,测定原型药物是放射性同位素法测定中要解决的关键问题,因为药物进入体内后会被降解,总放射性测定不能代表原型药物,为此采用 TCA 沉淀蛋白法,使尖吻蝮蛇凝血酶沉淀下来而分解产物及游离 ^{125}I 留在上清液中被除去,以使测定结果尽可能接近原型尖吻蝮蛇凝血酶的浓度。

从 RA 法和 TCA-RA 法研究的尖吻蝮蛇凝血酶组织分布表明,肝、脾和心在给药后 5 min 药物含量最高,其他绝大部分组织在给药后 30 min 药物

含量最高,以后逐渐降低,总放射性与原型药物在各组织分布的大小顺序基本一致。其中在大多数时间肝、脾、肾、肺含药量较高,脑、脂肪含药量较低。

静脉注射给药后 96 h 内,有给药总量的 73.52% 由尿中回收,12.13% 由粪中回收,这部分可能与分布到胃肠及胆汁排泄有关,24 h 内胆汁累积排泄量为 4.16%。尿、粪 96 h 的总回收率达到 85.65%,说明尖吻蝮蛇凝血酶的排泄消除去向已较清楚。因此认为尖吻蝮蛇凝血酶排泄较完全,并主要由尿排泄。

尖吻蝮蛇凝血酶是一种糖蛋白,与血浆蛋白无特异性结合,国外文献和新药申报均未见有关蛋白结合报告,而且由于其药效作用(与血浆蛋白的作用)问题,会影响药物与蛋白的分离,不便进行游离药物的测定,因此本研究未测定相关结果。

参考文献:

- [1] 吴忠. 尖吻蝮蛇凝血酶用作出血性疾病的药物: 中国, CN1218747[P]. 2003-08-14.
- [2] 吴忠. 止血一类新药 Halase 的药效学研究[J]. 中药材, 2005,28(2): 125-128.
WU Zhong. The pharmacodynamics study of a new hemostatic Halase[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2005,28(2):125-128.
- [3] 苏薇薇. 止血一类新药 Halase 的长期毒性试验[J]. 中药材, 2005,28(3): 211-212.
SU Weiwei. The long-term toxicity test of a new hemostatic Halase[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2005,28(3):211-212.
- [4] 吴忠. 止血一类新药 Halase 的一般药理学研究[J]. 中药材, 2005,28(4): 326-327.
WU Zhong. The general pharmacological study of a new hemostatic Halase[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2005,28(4):326-327.
- [5] 邓沁, 吴忠, 彭维, 等. 尖吻蝮蛇凝血酶分离纯化新工艺研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2016, 55(6):161-164.
DENG Qin, WU Zhong, PENG Wei, et al. New process for separation and purification of Haemocoagulase Acutus[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2016,55(6):161-164.
- [6] 邓沁, 吴忠, 苏薇薇, 等. 一类新药尖吻蝮蛇凝血酶对 SD 大鼠围产期生殖毒性试验[J]. 中南药学, 2017, 15(6):730-734.
DENG Qin, WU Zhong, SU Weiwei, et al. Perinatal reproductive toxicity of Halase in perinatal Sprague-Dawley rats[J]. Central South Pharmacy, 2017,15(6): 730-734.