

重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子栓在雌性大鼠体内药动学研究

张星艳^{1,2}, 于飞³, 伊秀林², 高晶², 刘昌孝², 李亚卓^{2*}, 曾勇^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津药物研究院新药评价有限公司 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300301

3. 天津医科大学 药学院, 天津 300071

摘要: **目的** 探讨重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 的栓剂经阴道给药和注射剂皮下给药后雌性 SD 大鼠阴道和宫颈组织的药动学行为。**方法** 雌性 SD 大鼠分别阴道给以 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rhGM-CSF 栓剂, rhGM-CSF 注射剂 sc 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 用酶联免疫测定法 (ELISA) 检测动物组织和血清中的药物浓度, 数据经 DAS 药动学程序处理并计算药动学参数。**结果** 大鼠阴道给予 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rhGM-CSF 栓剂后, 阴道和宫颈组织药物消除半衰期 ($t_{1/2ke}$) 分别为 0.54、0.70、1.19 h; 达峰时间 (t_{peak} , 实测值) 均为 0.5 h; 达峰浓度 (C_{max} , 实测值) 分别为 35.24、61.45、125.55 ng/g, 药-时曲线下面积 ($\text{AUC}_{0-8\text{h}}$) 分别为 40.40、75.89、334.90 h·ng/g (统计矩法计算)。100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 栓剂给药后, 与 sc 相同剂量的 rhGM-CSF 注射剂比较, 测得的最大血药浓度仅有后者的约 1/250。**结论** rhGM-CSF 栓剂阴道给药后主要作用于局部, 对全身作用的影响极小。

关键词: 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子栓; 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子; 雌性 SD 大鼠; 阴道给药; 药动学
中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)10-2477-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.10.002

Pharmacokinetic study of Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Suppositories in female rats

ZHANG Xing-yan^{1,2}, YU Fei³, YI Xiu-lin², GAO Jing², LIU Chang-xiao², LI Ya-zhuo², ZENG Yong²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd, Tianjin 300301, China

3. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300071, China

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetics behavior of recombinant human Granulocyte macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) in tissues of vagina and cervix of female SD rats after vaginal and sc administration with suppositories and injections. **Methods** Female SD rats were given rhGM-CSF Suppositories at 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ by vaginal administration and rhGM-CSF injection at 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dose by subcutaneous administration. The contents of rhGM-CSF in vagina and cervix tissues were determined by ELISA method, as well as the 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dose rhGM-CSF concentration in plasma. Pharmacokinetic parameters were calculated by using DAS software. **Results** The pharmacokinetic parameters for 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of rhGM-CSF Suppositories were as following: the elimination half-life ($t_{1/2ke}$) were 0.54, 0.70, and 1.19 h, respectively. The peak time (t_{peak} , measured value) was 0.5 h, and the peak concentrations (C_{max} , measured value) were 35.24, 61.45, and 125.5 ng/g, respectively. the area under the curve ($\text{AUC}_{0-8\text{h}}$) calculated were 40.40, 75.89, and 334.9 h·ng/g, respectively. After vaginal administration at the 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dose, the drug concentration measured in plasma was only about 1/250 of of rhGM-CSF Injection. **Conclusion** rhGM-CSF Suppositories mainly act on local tissue after vaginal administration, and have limited impact or effect systematically.

Key words: Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Suppositories; rhGM-CSF; female SD rat; vaginal administration; pharmacokinetics

收稿日期: 2018-03-29

作者简介: 张星艳, 女, 硕士研究生, 主要研究方向为药动学。E-mail: xingyanz@yeah.net

*通信作者 曾勇, 男, 研究员。E-mail: zengy@tjpr.com

李亚卓, 男, 副研究员。E-mail: liyz8@tjpr.com

粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 作为一种生物细胞因子, 可以促进骨髓中前体细胞的增殖、加速吞噬细胞对真菌和细菌的摄取、增加单核巨噬细胞和中性粒细胞的杀菌活性, 在炎症反应中扮演着重要的角色^[1-5]。有文献报道表明, 1 名单纯疱疹病毒复发性生殖器感染的妇女经过 6 d sc 300 mg/d 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 治疗后, 观察到患者的免疫功能逐渐正常化, 临床症状表现也逐渐消失, 说明 rhGM-CSF 可以用于治疗生殖器的炎症^[6]。因此本研究为了观察不同剂量的 rhGM-CSF 栓剂在单次大鼠给药后局部组织的药物动力学, 同时检测血清中药物浓度, 并与 sc rhGM-CSF 注射剂进行了比较, 为临床试验提供参考。

1 材料

rhGM-CSF 栓由长春金赛药业有限公司提供, 0.1 g/栓, 有 3 种规格, 分别为 10、20、40 μg /栓, 批号分别为 20060920-1、20060920-2、20060920-3, 试验前在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存; rhGM-CSF 注射液由长春金赛药业有限公司提供, 规格 300 μg /瓶, 批号 20060907, 试验前在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存; ELISA 检测 rhGM-CSF 试剂盒由晶美生物工程有限公司出品, 批号 200601010; 样品稀释液: 含 10% 空白大鼠血清的 0.05 mol/L PBS (pH 7.4)。

Zenyth1100 型多功能酶标板扫描仪 (奥地利 Anthos 公司); XHF-1 高速分散器 (上海金达生化仪器有限公司); H2050R 高速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); SOP 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

雌性 SD 大鼠, 体质量 190~205 g。由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (津) 2005-6001。

2 方法与结果

2.1 ELISA 测定方法

按照试剂盒说明书, 在预包被第一抗体的 96 孔微孔板上, 每孔加 100 μL 样品液 (标准品或待测样品), 双复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒保温 90 min 后, 甩去孔内液体, 洗板 (30 s \times 4), 控干洗涤液, 除空白孔外每孔加生物素化抗体液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒保温 60 min, 洗板 (30 s \times 4), 除空白孔外每孔加酶结合物工作液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒保温 30 min 后, 洗板 (30 s \times 4), 每孔加显色剂 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 15 min, 然后每孔加 100 μL 终止液终止反应。混匀

后在酶标仪 450 nm 波长读取各孔吸光度 (A_{450}) 值。

2.2 给药剂量的设定

根据 rhGM-CSF 栓剂的药效实验剂量和预实验结果, 选择 rhGM-CSF 栓剂 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个剂量, 注射剂对照组 sc 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rhGM-CSF 注射剂。

2.3 血清和组织样本的采集

栓剂组大鼠阴道给药后分别在 0 (给药前)、0.08、0.17、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12 h 处死, 立即摘取内生殖器官 (阴道和子宫), 分离阴道+宫颈组织, 用剪刀剖开内壁, 用 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的生理盐水洗涤 4 次。滤纸吸干组织后称定质量, 加定量生理盐水制成 10% 匀浆, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组动物处死前先从眼静脉取血并离心分离血清 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。每组每个时间点均为 5 只动物。

注射剂对照组动物分别于 0 h (给药前) 和皮下给药后 0.17、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12 h 从眼静脉丛取血, 并离心分离血清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取血后处死动物同以上方法取动物的生殖器官, 制备匀浆, 离心取上清液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。每个时间点均为 5 只动物。

2.4 标准曲线的绘制

标准曲线是用样品稀释液配制不同质量浓度的 rhGM-CSF 溶液, 使终质量浓度分别为 0、7.8、15.6、31.2、62.5、125、250、500 pg/mL 。按“ELISA 测定方法”项下操作, 测定在 450 nm 处的 A_{450} 值。以质量浓度的对数值为横坐标, A_{450} 值为纵坐标作图。结果 rhGM-CSF 在 7.8~500 pg/mL 与 A_{450} 值线性关系良好, 其回归方程为 $A_{450}=0.808\ 83\ \lg C - 0.637\ 27$ ($r=0.996\ 5$)。最低定量下限 (LLOQ) 为标准曲线的最低浓度点, 即 7.8 pg/mL 。

2.5 精密度和准确度试验

将 rhGM-CSF 用样品稀释液配成质量浓度分别为 15.6、62.5、250 pg/mL 的 3 个质控样品, 在同一块酶标板和不同酶标板上每个质量浓度分别测定 5 次, 考察所测定浓度范围内的精密度和准确度。精密度以板内、板间 5 次测定的 RSD 值表示, 准确度为测定值与真实值的接近程度。结果见表 1。结果表明在上述 3 种质量浓度下, 板内精密度 RSD 值均小于 5%, 板间精密度 RSD 值均小于 10%; 板内准确度为 98.1%~103.2%, 板间准确度为 93.8%~107.5%。

表1 精密度和准确度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Results of precision and accuracy tests ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度/ (pg·mL ⁻¹)	板内			板间		
	测定值/(pg·mL ⁻¹)	精密度/%	准确度/%	测定值/(pg·mL ⁻¹)	精密度/%	准确度/%
15.6	16.09±0.14	0.86	103.2	14.93±0.77	5.19	95.7
62.5	61.31±1.71	2.80	98.1	58.6±3.64	6.21	93.8
250	252.7±5.97	2.36	101.1	268.7±14.9	5.54	107.5

2.6 特异性试验

以 NTα1、GCSF、IL-11、IL-6、IFNβ、IFNα、TNFα 7 种血液中可能含有的内源性物质为试验对象, 与 10 ng/mL rhGM-CSF 一起使用 ELISA 试剂盒测定, 结果见表 2。结果显示内源性物质的 A₄₅₀ 值读数均远低于最低检测量的 A₄₅₀ 值, 表明上述内源性物质与测定 rhGM-CSF 时无明显交叉反应。

表2 特异性试验结果

Tab 2 Results of specificity test

样品	A ₄₅₀ (扣除本底)	质量浓度/(pg·mL ⁻¹)
NTα1	0.032	—
GCSF	-0.003	—
IL-11	0.013	—
IL-6	0.022	—
IFNβ	0.008	—
IFNα	-0.001	—
TNFα	0.007	—
rhGM-CSF	0.157	7.8

—: 表示未检测到
“—”indicated not detected

2.7 回收率试验

将空白大鼠阴道+宫颈组织加生理盐水制成 10%组织匀浆, 加入 rhGM-CSF 至终质量浓度分别为 15.6、62.5、250 pg/mL, 置于 37 °C 水浴中保温 60 min, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液测定药物质量浓度, 计算回收率, 结果见表 3。

表3 回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Results of recovery test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度/ (pg·mL ⁻¹)	测定值/ (pg·mL ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
15.6	15.5±0.5	99.4	3.23
62.5	59.1±1.9	94.5	3.21
250	245.8±24.3	98.3	9.89

2.8 稳定性试验

配制质量浓度分别为 15.6、62.5、250 pg/mL 的质控样品 5 组 (每组每个质量浓度各 3 个样品), 分别按不同条件下存放, 得到样品 1 (在 -20 °C 储存 20 d)、样品 2 (-20 °C 储存 10 d 后 4 °C 解冻 1 d, 再 -20 °C 储存 9 d)、样品 3 (-20 °C 储存 1 d)、样品 4 (4 °C 储存 1 d) 和样品 5 (25 °C 储存 1 d)。保存条件结束后, 在室温下解冻立即测定, 结果见表 4。

表4 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Results of stability test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	质量浓度/ (pg·mL ⁻¹)	测定值/(pg·mL ⁻¹)	RE/%	RSD/%
1	15.6	14.1±0.2	90.4	1.42
	62.5	56.6±2.8	90.6	4.95
	250	251.3±16.5	100.5	6.57
2	15.6	14.9±0.1	95.4	0.67
	62.5	55.0±2.7	88.1	4.91
	250	264.1±6.7	105.6	2.54
3	15.6	15.1±0.3	96.7	1.99
	62.5	53.8±2.8	86.1	5.20
	250	280.7±10.9	112.3	3.88
4	15.6	15.2±1.0	97.7	6.58
	62.5	60.6±2.5	96.9	4.13
	250	258.3±35.6	103.3	13.78
5	15.6	15.0±0.4	96.1	2.67
	62.5	59.9±2.6	95.9	4.34
	250	259.0±20.3	103.6	7.84

2.9 rhGM-CSF 质量浓度的测定

测定实验动物在不同时间点的组织匀浆上清液和血清样品时, 均制备 1 条随行标准曲线。

2.9.1 栓剂组组织中 rhGM-CSF 质量浓度测定 随着给药剂量的增加, 阴道和子宫组织内的 rhGM-CSF 质量浓度也随之增加, 50、100、200 μg/kg 剂量组的药物行为模式基本一致, 达到峰值后 rhGM-

CSF 质量浓度逐渐减少直至趋于 0。平均组织药物质量浓度 - 时间曲线见图 1。

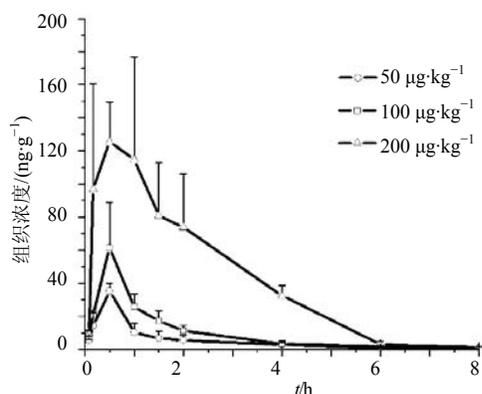


图 1 rhGM-CSF 栓剂阴道给药后的组织药物质量浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Mean tissue concentration - time curve after vaginal administration of rhGM-CSF ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.9.2 栓剂和注射剂 (100 μg/kg) 组组织和血清中 rhGM-CSF 质量浓度测定 rhGM-CSF 注射剂 sc 100 μg/kg 后和同等剂量的 rhGM-CSF 栓剂阴道给药后的血药浓度 - 时间曲线对比见图 2, 组织药物质量浓度 - 时间曲线对比见图 3。可以看出, 皮下注射给予 rhGM-CSF 注射剂后, 在血清中的药物质量浓度远远高于 rhGM-CSF 栓剂阴道给药后的血清质量浓度, rhGM-CSF 栓剂在血清中几乎没有分布, 因此基本检测不到血清中的 rhGM-CSF, 但在阴道和子宫组织中的质量浓度十分高, 而 rhGM-CSF 注射剂在相应组织中几乎不存在, 表明在给药后组织对 rhGM-CSF 栓剂的吸收十分完全。

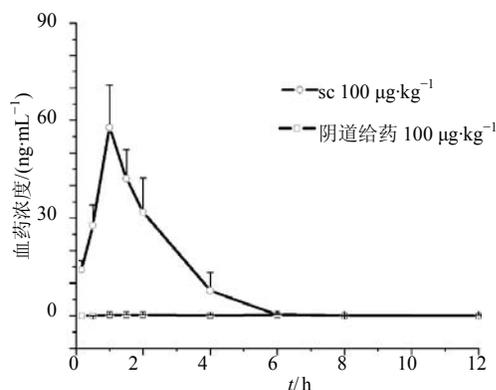


图 2 rhGM-CSF 注射剂和栓剂 (100 μg/kg) 血药浓度-时间曲线对比 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Comparison of plasma drug concentration - time curve of rhGM-CSF by either subcutaneous or vaginal administration at 100 μg/kg ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

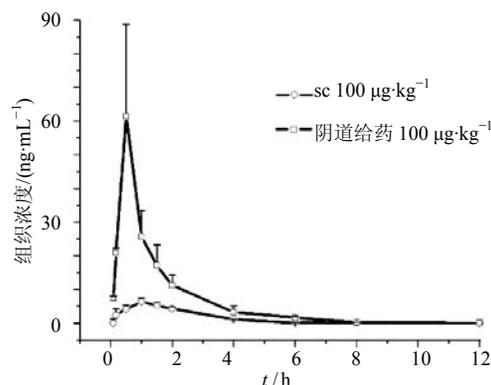


图 3 rhGM-CSF 注射剂和栓剂 (100 μg/kg) 组织浓度-时间曲线对比 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Comparison of tissue drug concentration - time curve of rhGM-CSF by either subcutaneous or vaginal administration at 100 μg/kg ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.10 药动学参数计算

将得到的组织和血药浓度数据用 DAS 药动学计算程序进行拟合处理。符合一房室消除模型 (权重 1/C), 药时曲线下面积 (AUC_{0-8 h}) 用统计矩法计算, 所得药动力学参数见表 5。大鼠阴道给予 50、100、200 μg/kg rhGM-CSF 栓剂后, 阴道+宫颈组织药物消除半衰期 $t_{1/2ke}$ 分别为 0.54、0.70、1.19 h, 达峰时间 t_{peak} (实测值) 均为 0.5 h, 达峰浓度 C_{max} (实测值) 分别为 35.24、61.45、125.55 ng/g, 药-时曲线下面积 (AUC_{0-8 h}) 分别为 40.40、75.89、334.90 h·ng/g (统计矩法计算)。

表 5 SD 大鼠阴道给予 rhGM-CSF 栓剂后组织药动学参数
Table 5 Main pharmacokinetic parameters of SD rats in tissues after a single vaginal administration

参数	单位	剂量/(μg·kg ⁻¹)		
		50	100	200
$t_{1/2ke}$	h	0.54	0.70	1.19
t_{peak}	h	0.50	0.50	0.50
C_{max}	ng·g ⁻¹	35.24	61.45	125.55
AUC _{0-8 h}	h·ng·g ⁻¹	40.40	75.89	334.90
CL/F(s)	h ⁻¹	1.71	1.55	0.67

血药浓度数据符合二房室消除模型 (权重 1/1), 所得药动力学参数见表 6。大鼠 sc 100 μg/kg rhGM-CSF 注射剂药物消除半衰期 $t_{1/2\beta}$ 为 0.74 h, 达峰时间 t_{peak} (实测值) 为 1.0 h, 达峰浓度 C_{max} (实测值) 为 57.92 ng/mL, 药-时曲线下面积 (AUC_{0-12 h}) 为 120.73 h·ng/mL。

表6 SD大鼠 sc rhGM-CSF注射剂(100 μg/kg)后血清药动学参数

Table 6 Main pharmacokinetic parameters of SD rats after subcutaneous administration at 100 μg/kg

参数	单位	数值
$t_{1/2\beta}$	h	0.74
K_{21}	h^{-1}	0.95
AUC	$h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	120.73
CL(s)	$L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.82
t_{peak}	h	1.0
C_{max}	$ng \cdot mL^{-1}$	57.92

3 讨论

由于生物样本的特殊性和复杂性,并且还存在着其他的活性物质和血清成分的干扰,因此就需要一种检测速度快、重复性好、特异性好、经济实惠的方法来检测 rhGM-CSF 的浓度^[7-12]。其中 ELISA 检测法可以满足以上的需求,测定技术十分成熟,故选择 ELISA 法测定 rhGM-CSF 试剂盒对大鼠血清和组织中的药物浓度进行测定。

本研究对 SD 大鼠阴道给予 50、100、200 μg/kg rhGM-CSF 栓后,阴道+宫颈组织药物浓度随着剂量的增加而增大,其中 50、100 μg/kg 剂量组的消除半衰期 $t_{1/2ke}$ 相近(分别为 0.54、0.70 h), C_{max} (分别为 35.24、61.45ng/ml)、AUC_{0-8h} (分别为 40.40、75.89 h·ng/g) 与剂量存在较明显的相关性,而 200 μg/kg 剂量组虽然达峰时间 t_{peak} (实测值)与 50、100 μg/kg 剂量组的一样,但 $t_{1/2ke}$ 明显延长(1.19 h), AUC_{0-8h} (334.90 h·ng/g) 增加的倍数也远远超过剂量增加的倍数,表明当栓剂剂量增大到 200 μg/kg 时, rhGM-CSF 在给药部位的吸收会出现饱和现象。大鼠阴道给予 100 μg/kg rhGM-CSF 阴道栓剂后,测得的血清药物浓度与皮下注射相同剂量的 rhGM-CSF 注射剂比较,最大血药浓度仅有后者的 1/250,表明 rhGM-CSF 阴道栓剂给药后主要作用于局部,对全身作用的影响极小。

参考文献

[1] Zhang Y, Chen J, Lv Z, et al. Can 29kDa rhGM-CSF expressed by silkworm pupae bioreactor bring into effect as active cytokine through orally administration? [J]. *Eur*

J Pharm Sci, 2006, 28(3): 212-223.

[2] Hu X, Sun H, Han C, et al. Topically applied rhGM-CSF for the wound healing: a systematic review [J]. *Burns*, 2011, 37(5): 729-741.

[3] Hibbs M L, Quilici C, Kountouri N, et al. Mice lacking three myeloid colony-stimulating factors (G-CSF, GM-CSF, and M-CSF) still produce macrophages and granulocytes and mount an inflammatory response in a sterile model of peritonitis [J]. *J Immunol*, 2007, 178(10): 6435-6443.

[4] Yuan L, Minghua C, Feifei D, et al. Study of the use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hydrogel externally to treat residual wounds of extensive deep partial-thickness burn [J]. *Burns*, 2015, 41(5): 1086-1091.

[5] Yan H, Chen J, Peng X. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hydrogel promotes healing of deep partial thickness burn wounds [J]. *Burns*, 2012, 38(6): 877-881.

[6] Altamura M, Geronimo M G, Nappi L, et al. Successful treatment of herpes simplex virus (HSV) recurrent genital infection with recombinant human (rh) granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): a case report [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1997, 19(4): 425-436.

[7] Cebon J, Dempsey P, Fox R, et al. Pharmacokinetics of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using a sensitive immunoassay [J]. *Blood*, 1988, 72(4): 1340-1347.

[8] 戴盛明,肖桂元,周少雄,等. ELISA 夹心法检测 rhGM-CSF/IL-3 融合蛋白 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1998, 5(2):130-131.

[9] Hovgaard D, Mortensen B T, Schifter S, et al. Clinical pharmacokinetic studies of a human haemopoietic growth factor, GM-CSF [J]. *Eur J Clin Invest*, 1992, 22(1): 45-49.

[10] Senet P, Mons B, Aractangi S, et al. Evaluation of the stability and efficacy of rhGM-CSF as a topical agent in a gel formulation [J]. *J Wound Care*, 2002, 11(4): 132-134.

[11] Zhang W, Lv Z, Nie Z, et al. Bioavailability of orally administered rhGM-CSF: a single-dose, randomized, open-label, two-period crossover trial [J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5353..

[12] 王 鉴. 蚕蛹粉对 rhGM-CSF 口服吸收影响的研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2012.