

注射用重组人成纤维细胞生长因子-21皮下注射对大鼠呼吸系统的影响

刘艳菊^{1,2}, 钟 飞¹, 项宗尚¹, 胡 雷^{1,*}, 兰天龙¹, 周博宇¹, 徐德璐¹

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

摘要: **目的** 应用全身体积描记法观察注射用重组人成纤维细胞生长因子-21 (rhFGF-21) 对大鼠呼吸系统的影响, 确定药物可能关系到人的安全性的非期望出现的药物效应, 为临床研究和安全用药提供参考。**方法** SD大鼠40只, 雌雄各半。实验设置4个组, 分别为溶媒对照组、rhFGF-21 1.5、3.0、6.0 mg/kg剂量组, 应用全身体积描记法采集清醒无束缚大鼠给药前、给药后0.25、1、2、4 h的呼吸功能指标。**结果** 与溶媒对照组比较, 各剂量组动物药后0.25、1、2、4 h均未见潮气量、每分钟通气量、呼吸频率出现统计学差异。**结论** 大鼠单次皮下注射给予6.0 mg/kg的rhFGF-21, 未见药物对大鼠呼吸系统指标产生明显影响。

关键词: 注射用重组人成纤维细胞生长因子-21; 全身体积描记法; 清醒大鼠; 呼吸系统

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 10-1986-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.10.012

Effect of subcutaneous injection of recombinant human fibroblast growth factor-21 on respiratory system in rats

LIU Yanju^{1,2}, ZHONG Fei¹, XIANG Zongshang¹, HU Lei^{1,2}, LAN Tianlong¹, ZHOU Boyu¹, XU Delu¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd, Tianjin 300301, China

2. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective Research on the effect of recombinant human fibroblast growth factor-21 (rhFGF-21) on respiratory system in rats by whole body plethysmography, to determine the undesired drug effects that may be related to human safety, and provide reference for clinical research and safe medication. **Methods** 40 SD rats were used in this study, 20 males and 20 females. Four groups were set up, which were vehicle control group, rhFGF-21 1.5, 3.0 and 6.0 mg/kg dose groups. Respiratory function indexes of conscious and unconstrained rats before and 0.25, 1, 2 and 4 hours after administration were collected by whole body plethysmography. **Results** Compared with the vehicle control group, there was no statistical difference in tidal volume, minute ventilation, and respiratory rate at 0.25, 1, 2, and 4 h after treatment. **Conclusion** Rats were given a single subcutaneous injection of 6.0 mg/kg rhFGF-21, there was no significant effect on the respiratory index in rats.

Key words: rhFGF-21; whole-body plethysmography; conscious rats; respiratory system

糖尿病是一种以胰岛素抵抗或胰岛素分泌不足为主要特征的慢性疾病, 发病率高, 已成为威胁我国人群健康的重大公共卫生问题^[1]。目前胰岛素是治疗糖尿病的主要药物, 但是长期使用胰岛素会产生胰岛素抵抗^[2-3]和破坏胰岛β细胞。研究发现, 成纤维细胞生长因子-21 (FGF-21) 是一种非胰岛素依赖的细胞因子, 具有降糖降脂、增加胰岛素敏感

性^[4-6]、保护胰岛β细胞^[7-8]等功能。与胰岛素相比, FGF-21具有过量不导致低血糖^[9]的优点, 而且FGF-21没有促进细胞有丝分裂的能力, 没有成瘤性^[10], 说明FGF-21在用药方面是比较安全的^[11]。有学者用FGF-21处理小鼠2型糖尿病模型, 发现FGF-21能够预防糖尿病后期诱导的心室重构和心脏功能紊乱^[12], 内源性FGF-21在糖尿病状态下也能发挥抗

收稿日期: 2019-04-09

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004), 天津市科技计划项目(16PTGCCX00090)

第一作者: 刘艳菊(1986—), 女, 天津, 助理研究员, 硕士, 研究方向为临床前药物安全性评价。Tel: 15102264435 E-mail: liuyj@tjpr.com

*通信作者: 胡 雷, 副研究员, 硕士, 研究方向为临床前药物安全性评价。E-mail: hul@tjpr.com

心肌细胞凋亡的作用^[13]。此外,有研究表明FGF-21还可以抑制糖尿病引起的肾功能不全^[14-15]。因此FGF-21有望成为代替胰岛素治疗糖尿病的新药。

本研究通过给予大鼠皮下注射rhFGF-21,应用全身体积描记法观察药物对清醒无束缚大鼠呼吸系统的影响,确定rhFGF-21可能关系到人的安全性的非期望出现的药物效应,为临床研究和安全用药提供参考。

1 材料和方法

1.1 药品

注射用重组人成纤维细胞生长因子-21(rhFGF-21),批号为20150101,规格为4 mg/支,由温州医科大学生物与天然药物开发中心有限公司生产。rhFGF-21冻干粉溶媒(rhFGF-21溶媒),批号为20150301,规格为10 mL/支,由温州医科大学生物与天然药物开发中心有限公司生产。

1.2 试验仪器

电子天平E3000-0.5,常熟市双杰测试仪器厂。超净工作台,天津市拉贝尔实验室设备有限公司。动物肺功能检测系统,Emka Technologies。

1.3 动物

SD大鼠,SPF级,40只,雌雄各半。购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于天津药物研究院新药评价有限公司动物实验楼(屏障环境)。饲养间温度控制在20~26℃,湿度40%~70%,换气次数不少于8次全新风/h,光照为12 h明12 h暗交替。动物质量合格证号11400700114493,生产许可证SCXK(京)2012-0001。

1.4 分组与给药

实验设置4个组,即溶媒对照组和rhFGF-21 1.5、3.0、6.0 mg/kg组,每组10只动物,雌雄各半。溶媒对照组皮下注射rhFGF-21溶媒,给药体积为1.5 mL/kg。

1.5 数据采集和分析

实验前对仪器参数进行校正,参数设置为气泵流量1.5 L/min,放大器放大倍数100,采样频率1 000 Hz,输入校准Low值0,High值为-50 mL/s。

实验时将动物放入体积描记箱中稳定10 min以上适应环境,当有效波形达90%时开始记录数据^[16],在每个时间点剔除因动物躁动等因素导致的数据丢失和显著的大幅度数值漂移,记录每只动物给药前及给药后0.25、1、2、4 h的数据。

1.6 观察指标

呼吸频率、潮气量、每分钟通气量。

1.7 统计学处理

应用SPSS 25软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

大鼠单次皮下注射给予1.5、3.0、6.0 mg/kg的rhFGF-21后,与溶媒对照组比较,各组动物药后0.25、1、2、4 h潮气量、呼吸频率、每分钟通气量均未出现统计学差异。见图1~图3。

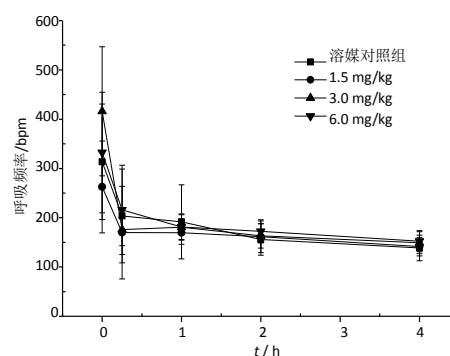


图1 大鼠呼吸频率的变化(n=10)

Fig. 1 Changes of respiratory frequency in rats(n=10)

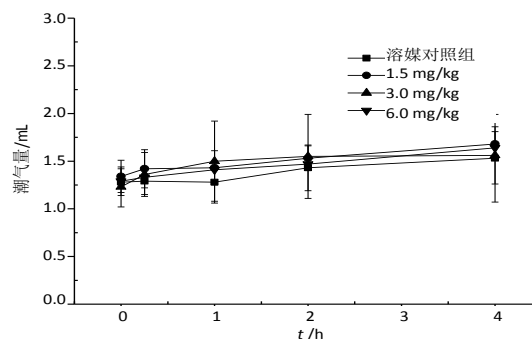


图2 大鼠潮气量的变化(n=10)

Fig. 2 Change of tidal volume in rats(n=10)

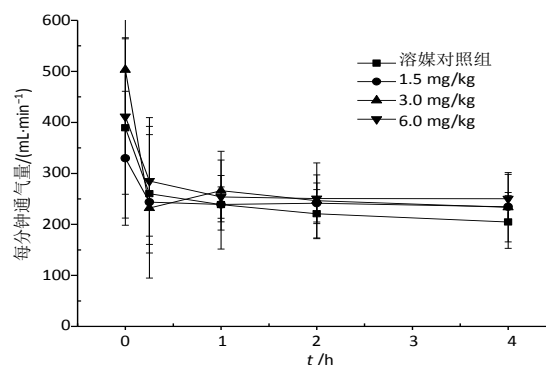


图3 大鼠每分钟通气量的变化(n=10)

Fig. 3 Change of minute ventilation in rats(n=10)

3 讨论

呼吸系统实验是安全药理学核心组合实验的重要组成部分^[17],应用麻醉动物进行研究,会因麻醉程度、麻醉时间和束缚产生的应激反应对评价结果产生干扰,导致评价结果准确性降低^[18],因此《药物安全药理学评价研究技术指导原则》建议使用清醒动物评价药物的安全性。目前国内部分实验室使用犬、猴、猪等大动物进行呼吸指标的采集,而本研究选择成本更为低廉的大鼠替代高等动物,应用全身体积描记法^[19]观察药物对清醒无束缚大鼠呼吸系统的影响,符合动物福利3R原则中的“替代”和“优化”。

在前期研究中,ob/ob小鼠皮下注射给予1.125 mg/kg的rhFGF-21,降糖效果明显,小鼠体质量以45 g计,大鼠平均体质量以250 g计,按体表面积折算,大鼠药效等效剂量为0.64 mg/kg;大鼠重复给予3个月6.0 mg/kg的rhFGF-21,动物未见明显异常。在安全药理试验剂量设计中,通常低剂量略高于药效学剂量,高剂量为可能产生轻微毒性反应的剂量,但是不能超过重复给药毒性试验的最高剂量,中剂量在低、高剂量之间,因此在本试验中低、中、高剂量分别设置为1.5、3.0、6.0 mg/kg,分别为大鼠药效等效剂量(0.64 mg/kg)的2.3、4.7、9.4倍。安全药理试验主要是根据药代结果进行检测时间点的设计,通常需要在达峰时间附近设计1~2个检测时间点,后面的检测时间点还要涵盖1~2个消除半衰期。在前期研究中得出, rhFGF-21皮下给药后在大鼠体内的达峰时间为0.95~2.25 h,消除半衰期为1.1~1.3 h,因此在rhFGF-21呼吸系统试验中检测时间点设计为给药前、给药后0.25、1.0、2.0、4.0 h。

研究显示与溶媒对照组比较,大鼠单次皮下注射给予重组人FGF-21后,潮气量、呼吸频率、每分钟通气量均未出现药物明显作用。从图形上看,给药前大鼠呼吸急促、呼吸频率较快,但是各组之间未见统计学差异,分析可能是动物未完全适应环境,仍处于紧张应激状态所致,提示应适当延长动物适应时间。综上所述,大鼠单次皮下注射给予6.0 mg/kg的rhFGF-21,未见药物对大鼠呼吸系统指标产生明显影响。

参考文献

- [1] 周婷,刘祥,李晓松,等. 中国人群2型糖尿病影响因素的Meta分析[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(5): 730-736.
- [2] Li Y B, Weng J P, Xu W, et al. The effects of short term continuous subcutaneous insulin infusion treatment on beta-cell function in newly diagnosed type 2 diabetic patients [J]. Chin J Diabetes, 2003, 11(1): 10-15.
- [3] Li H Z, Wang M, Liu X H, et al. The effects of short-term intensive insulin treatment on pancreatic β cell function in newly diagnosed type 2 diabetic patients [J]. J Chin Phys, 2004, 6(1): 82-83.
- [4] Xu J, Lloyd D J, Hale C, et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice [J]. Diabetes, 2009, 58(1): 250-259.
- [5] 徐彤宇, 王文飞, 徐鹏飞, 等. 成纤维细胞生长因子21对胰岛素抵抗缓解作用机制的研究 [J]. 药学报, 2015, 50(9): 1101-1106.
- [6] Sarruf D A, Thaler J P, Morton G J, et al. Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats [J]. Diabetes, 2010, 59(7): 1817-1824.
- [7] 龚琦, 张菲菲, 韩亚美, 等. FGF21的代谢调控及临床应用 [J]. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(4): 460-468.
- [8] Mashili F L, Austin R L, Deshmukh A S, et al. Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2011, 27(3): 286-297.
- [9] Inagaki T, Dutchak P, Zhao G X, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21 [J]. Cell Metab, 2007, 5(6): 415-425.
- [11] Kliewer S A, Mangelsdorf D J. Fibroblast growth factor 21: from pharmacology to physiology [J]. Am J Clin Nutr, 2010, 91(1): 254S-257S.
- [12] 张芳芳, 林秀飞, 陈聪聪, 等. Akt在FGF21预防糖尿病心肌病中的作用研究 [J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(7): 490-496, 502.
- [13] Zhang C, Huang Z F, Gu J L, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway [J]. Diabetologia, 2015, 58(8): 1937-1948.
- [14] Zhang C, Shao M L, Yang H, et al. Attenuation of hyperlipidemia- and diabetes-induced early-stage apoptosis and late-stage renal dysfunction via administration of fibroblast growth factor-21 is associated with suppression of renal inflammation [J]. Plos One, 2013, 8(12): e82275. DOI:10.1371/journal.pone.0082275.
- [15] Shao M L, Yu L C, Zhang F F, et al. Additive protection by LDR and FGF21 treatment against diabetic nephropathy in type 2 diabetes model [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015, 309(1): 45-54.
- [16] 方贤磊, 李杨, 聂李亚, 等. 肺功能分析在放射性肺损伤防治药物药效评价中的作用 [J]. 军事医学, 2015, 39(7): 519-522.
- [17] CFDA. 药物安全药理学研究技术指导原则 [EB/OL]. (2014-05-13) [2018-07-06]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=187>.
- [18] 潘水珍, 张利棕, 潘永明, 等. 生理遥测和全身体积描记法联用观测清醒大鼠昼夜节律变化及其在多索茶碱安全药理学中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 438-443, 449.
- [19] 刘艳菊, 周博宇, 钟飞, 等. 全身体积描记法在大鼠呼吸系统试验中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(8): 1391-1394.