

c-fos 编码的 c-Fos 蛋白被用作脊髓神经元传导痛觉的间接指标。EERD 对 AA 大鼠脊髓 c-Fos 蛋白的表达有显著地抑制作用,进一步验证了 EERD 对疼痛的抑制作用。由此可见,EERD 的镇痛作用可能通过抑制 PGE₂ 和 IL-1 β 的产生,抑制 iNOS 的活力从而减少 NO 在脑组织形成,通过提高 SOD 和 CAT 活性抑制超氧化物产生,加速清除氧自由基的方式来实现的。

References:

- [1] Zheng W F, Wang L, Shi F. Anti-inflammatory activity of ethanol extracts from root of *Daphne genkwa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(11): 1262-1269.
- [2] Martin B R, Compton D R, Thomas B F, et al. Behavioral biochemical and molecular modeling evaluation of cannabinoid analogs [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1991, 40: 471-478.
- [3] Hunt S P, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat [J]. *Nature*, 1987, 328: 632-634.
- [4] Bullit E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat [J]. *J Comp Neural*, 1990, 296: 517-530.
- [5] Magda A M, Newton S C, Deborah S, et al. Analgesia and c-Fos expression in the periaqueductal gray induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats [J]. *Brain Res*, 2003, 973: 196-204.
- [6] Pan H J, Wang H Y, Xu J Y, et al. Research on acupuncture-induced changes in pain threshold and brain-stem NO/NOS in experimental RA rats [J]. *Shanghai J Acupunct Moxib* (上海针灸杂志), 2002, 21: 48-50.
- [7] Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients [J]. *Toxicology*, 2003, 189: 113-127.
- [8] Samad T A, Moore K A, Sapirstein A, et al. Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity [J]. *Nature*, 2001, 410: 471-475.
- [9] Hulkower K I, Wertheimer S J, Levin W, et al. Interleukin-1 beta induces cytosolic phospholipase A₂ and prostaglandin H synthase in rheumatoid synovial fibroblasts: Evidence for their roles in the production of prostaglandin E₂ [J]. *Arthritis Rheum*, 1994, 37: 653-661.
- [10] Kindgen-Milles D, Arndt J O. Nitric oxide as a chemical link in the generation of pain from veins in humans [J]. *Pain*, 1996, 64: 139-142.
- [11] Tedesco L S, Fuseler J, Grisham M, et al. Therapeutic administration of nitric oxide synthase inhibitors reverses hyperalgesia but not inflammation in a rat model of polyarthritis [J]. *Pain*, 2002, 95(3): 215-223.
- [12] Fitzgerald M. C-fos and the changing face of pain [J]. *Trend Neurosci*, 1990, 13: 430-440.
- [13] Tsou K, Lowitz K A, Hohmann A G. Superexpression of noxious stimulus-evoked expression of fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord by a selective cannabinoid agonist [J]. *Neuroscience*, 1996, 70: 791-798.

酶联免疫法研究天花粉蛋白突变体在猕猴体内的药动学

蔡永明¹, 孙超渊¹, 李 铭¹, 陈拯民¹, 刘昌孝¹, 储瑞蕊²

(1. 天津药物研究院 药代动力学与药效动力学部共建国家重点实验室, 天津 300193;

2. 北京翔天牧生物科技有限公司, 北京 100076)

摘要:目的 研究猕猴 iv 天花粉蛋白突变体 (MTCS) 的药动学。方法 猕猴 iv MTCS 220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后, 采用酶联免疫分析法 (ELISA) 测定动物血清中的药物质量浓度, 血药浓度-时间数据用 3P97 药动程序拟合分析并计算药动学参数。结果 MTCS 在猕猴体内消除符合二房室模型。6 只猕猴的平均消除半衰期 ($t_{1/2\beta}$) 为 (3.82 $\pm$ 1.42) h, 平均消除速率 (CL) 为 (276.51 $\pm$ 118.61) mL/(kg $\cdot$ h), 药时曲线下面积 (AUC_{0-24h}) 为 (1 124.1 $\pm$ 189.5) ng $\cdot$ h/mL。结论 用 ELISA 方法能准确测定动物血清中 MTCS 质量浓度和研究其药动学。

关键词: 天花粉蛋白突变体 (MTCS); 酶联免疫分析法 (ELISA); 药动学; 猕猴

中图分类号: R285.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)03-0402-04

In vivo pharmacokinetics on mutant of trichosanthes in macaque by enzyme-linked immunosorbent assay

CAI Yong-ming¹, SUN Chao-yuan¹, LI Ming¹, CHEN Zheng-min¹, LIU Chang-xiao¹, CHU Rui-ai²

(1. National Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. Beijing STM BIO-Tech Co., Ltd., Beijing 100076, China)

Abstract: Objective To study the pharmacokinetics on mutant of trichosanthes (MTCS) after iv administration in macaque. **Methods** Serum drug concentration was measured by an enzyme-linked im-

收稿日期: 2005-06-19

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2003AA2Z347D); 国家“973”计划资助项目 (2004CB518902)

作者简介: 蔡永明 (1962-), 女, 天津人, 副研究员, 主要从事生物工程新药的药动学研究。

Tel: (022) 23006871 Fax: (022) 27375473 E-mail: caiymtj@126.com

munosorbent assay (ELISA) after iv injection at a dose of 220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to macaque, the pharmacokinetic model and parameters were fitted and calculated from the concentration-time data by a 3P97 program.

Results The serum drug concentration-time curve was fitted to a two-compartment model. The pharmacokinetic parameters were as follows: the mean elimination half life ($t_{1/2\beta}$) was (3.82 ± 1.42) h; the mean serum clearance (CL) was (276.51 ± 118.61) mL/(kg · h) and the mean area under the serum concentration-time curve ($\text{AUC}_{0-24\text{h}}$) was $(1\,124.1 \pm 189.5)$ ng · h/mL. **Conclusion** The enzyme-linked immunosorbent assay is shown to be accurate for determination of serum concentration of MTCS and suitable for pharmacokinetic study of MTCS.

Key words: mutant of trichosanthes (MTCS); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); pharmacokinetics; macaque

天花粉蛋白 (trichosanthes, TCS) 是从栝楼根中提取的一种碱性蛋白质, 相对分子质量为 2.7×10^4 [1]。国外研究资料表明天然天花粉蛋白 (mutant of trichosanthi, MTCS) GLQ223 具有抗人免疫缺陷病毒 (HIV) 的活性, 临床上可用于治疗艾滋病 [2~4]。MTCS 是中国科学院上海细胞所利用基因工程技术制备的天花粉蛋白突变体, 其相对分子质量为 2.6×10^4 。它是将天花粉蛋白加以改造, 去掉其中的强抗原性, 使其只作用于趋化因子受体, 而没有其他的反应, 而且保持了天花粉蛋白的生物活性。MTCS 作为一种生物工程制品目前已经开始在临床上用于艾滋病的治疗。本实验研究 MTCS 在猕猴体内的药动学过程, 旨在为临床合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物: MTCS 由中国科学院上海细胞所提供, 质量浓度为 5.1 mg/mL, 批号 20011001, 样品为无色透明液体, HPLC 法测其质量分数为 10%。实验前样品于 -20°C 保存。

1.2 质控样品: 用于方法学研究的 MTCS, 质量浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 样品为无色透明液体。实验前样品于 -20°C 保存。

1.3 检测 MTCS 的 ELISA 试剂盒: 由卫生部临床检验中心提供。该试剂盒由专一性抗 MTCS 单克隆抗体预包被的 96 孔板和专一性抗 MTCS 的酶标多克隆抗体组成, 酶反应底物为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)。显色后在酶标仪上读取各孔 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

1.4 主要仪器: 550 型酶标微板读数仪, 美国 Bio-red 公司产品。

1.5 实验动物: 健康成年猕猴 6 只, 体重 5~7 kg, 雌雄各半, 4~5 岁。由苏州西山中科实验动物中心生产并提供。实验动物质量合格证: 中科沪动管第 99-0011 号。实验动物设施合格证: 中科沪动管第 99-0010 号。

1.6 剂量的确定和给药方法: 小鼠 iv MTCS 的有效剂量为 1 mg/kg。按体表面积折合 [5], 猕猴约为 220 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 以该剂量作为本实验中猕猴 iv 给药的剂量。将药物用生理盐水稀释成 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (即 0.4 mL/kg) 后, 按 220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量于动物大腿内侧隐静脉 iv 给药。

1.7 血清样品的制备: 于给药前和给药后 2、5、15、30、60、120、180、240、360、480、720 和 1 440 min 从猕猴给药对侧后肢隐静脉取血, 室温放置 30 min 后, 于 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, -20°C 保存待测。

1.8 测定方法: 在预包被第一抗体的 96 孔微孔板上, 每孔分别加入样品标本 (标准品或待测样品) 和酶标抗体各 50 μL , 双复孔, 振荡混匀 1 min。37 $^\circ\text{C}$ 保温 1 h 后, 除去孔内液体, 洗板 4 次。每孔加 100 μL 底物液 TMB, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 20 min, 每孔加 50 μL 硫酸终止反应。在酶标仪 450 nm 波长处读取各孔的 A 值。

1.9 参数计算: 血药浓度-时间数据用 3P97 药动程序拟合分析并计算药动学参数, 采用梯形法计算 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 值, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 ELISA 法测定血药浓度方法的建立和确证

2.1.1 标准曲线、线性范围和最低定量限: 标准曲线是用含动物空白血清的样品稀释液配制不同质量浓度的 MTCS 溶液, 使终质量浓度分别为 0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 和 8.00 ng/mL。按 1.8 项下内容操作, 测定 450 nm 的 A 值即可制得标准曲线。结果在此质量浓度范围内 (0.25~8.0 ng/mL), 药物质量浓度对数与 A 值对数呈直线相关。直线回归方程为 $\lg A = 0.5254 + 0.9257 \lg C$, $r = 0.999$ 。最低检出限为标准曲线的最低质量浓度点, 即 0.25 ng/mL。

2.1.2 样品标准曲线和药盒标准品曲线间的平行

性测验:分别用药盒中的 MTCS 标准品和样品标准品(质控样品)同时制备两条标准曲线,使其终质量浓度均分别为 0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 和 8.00 ng/mL,比较两条标准曲线的相关性。结果显示两条标准曲线基本平行且重合,说明该药盒符合本研究中样品的测定。两个直线回归方程分别为 $\lg A = -0.4949 + 0.9109 \lg C$, $r = 0.999$ (药盒标准品); $\lg A = -0.4670 + 0.9035 \lg C$, $r = 0.999$ (样品标准品)。

2.1.3 相对回收率、精密度和准确度:ELISA 法测定动物血清中 MTCS 的质量浓度,在 0.5、2.0、6.0 ng/mL 内平均相对回收率为 $(81.1 \pm 2.8)\%$ ($n = 5$)。批内和批间精确度 (RSD) 分别为 2.6%~6.0% 和 10.3%~15.7% ($n = 5$);准确度分别为 -16.5%~-20.0% 和 -2.0%~2.0%。

2.1.4 特异性:本试剂盒对白细胞介素-11 (IL-11)、白细胞介素-6 (IL-6)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、干细胞因子 (SCF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、生长激素 (GH)、 α 干扰素 (IFN- α) 和 β 干扰素 (IFN- β) 等细胞因子均无交叉反应。

2.1.5 样品稀释对测定样品中 MTCS 质量浓度的影响:因本实验中部分血清样品含 MTCS 质量浓度过高,需要稀释后才能符合标准曲线测定要求,为此考察了样品稀释后对所测样品中 MTCS 质量浓度的影响。制备含 MTCS 质量浓度为 1 μ g/mL 的猕猴血清样品,用样品稀释液(含 0.2% BSA 的 PBS 溶液)稀释 125 倍后使 MTCS 终质量浓度为 8.0 ng/mL,再稀释 4 次使最终稀释度分别为 1:125、1:250、1:500、1:1 000 和 1:2 000,测定各稀释样品中 MTCS 的质量浓度,并检测实测值与期望值间的关系。计算出期望指数。结果表明按 1:125、1:250、1:500、1:1 000 和 1:2 000 稀释后,实测值分别是期望值的 94.4%、92.4%、90.4%、90.8% 和 78.0%。说明当稀释度不大于 1:1 000 时,用稀释液稀释样品对测定结果影响不大,期望指数在 90.4%~94.4%。

2.2 血药浓度测定和药动力学参数的计算:猕猴 iv MTCS 220 μ g/kg 后的平均血药浓度-时间曲线见图 1。血药浓度-时间数据用 3P97 药动计算程序进行数据处理。经拟合优度分析,药物消除符合二房室模型,6 只猕猴的平均消除半衰期 ($t_{1/2\beta}$) 为 (3.82 ± 1.42) h,平均消除速率 (CL) 为 (276.51 ± 118.61) mL/(kg $\cdot$ h),药时曲线下面积 (AUC_{0~24 h}, 梯形法) 为 $(1 124.1 \pm 189.5)$ ng $\cdot$ h/

mL。药动力学参数结果见表 1。

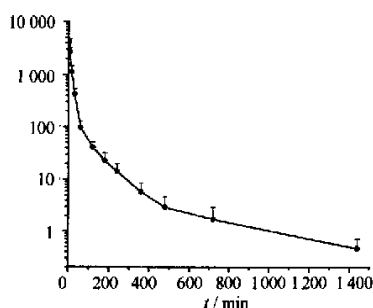


图 1 猕猴 iv MTCS (220 μ g/kg) 后的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Mean serum drug concentration-time curve of iv MTCS at dose 220 μ g/kg in macaque ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 1 猕猴 iv MTCS (220 μ g/kg) 后的平均药动力学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Mean pharmacokinetic parameters of iv MTCS (220 μ g/kg) in macaque ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

参 数	单 位	MTCS
A	ng $\cdot$ mL ⁻¹	3 045.0 $\pm$ 1 420.5
α	h ⁻¹	3.7 $\pm$ 1.4
B	ng $\cdot$ mL ⁻¹	24.4 $\pm$ 17.6
β	h ⁻¹	0.2 $\pm$ 0.1
$V_{(c)}$	mL $\cdot$ kg ⁻¹	123.4 $\pm$ 146.6
$t_{(1/2\alpha)}$	h	0.2 $\pm$ 0.2
$t_{(1/2\beta)}$	h	3.8 $\pm$ 1.4
K_{21}	h ⁻¹	0.2 $\pm$ 0.1
K_{10}	h ⁻¹	3.3 $\pm$ 1.2
K_{12}	h ⁻¹	0.4 $\pm$ 0.3
AUC _{0~24 h}	ng $\cdot$ h $\cdot$ mL ⁻¹	1 124.1 $\pm$ 189.5
CL	mL $\cdot$ kg ⁻¹ $\cdot$ h ⁻¹	276.5 $\pm$ 118.6

3 讨论

本实验所用 ELISA 药盒中的抗体是针对 MTCS 的单克隆和多克隆抗体组成的。不论用药盒提供的标准品或用本实验中质控样品制备的标准曲线,MTCS 质量浓度对数与 A 值对数均呈直线相关;两条标准曲线基本平行且重合。为确保血药浓度测定的准确性,每次试验均制备一条质控样品的标准曲线。本方法的相对回收率、精密度和最低检出限以及样品经稀释后再测定均能符合新药药动力学的实验要求。本方法标准曲线测定的质量浓度线性范围为 0.25~8.0 ng/mL,动物给药后某些时间点的血药浓度超出了线性范围,需要做适当稀释,最高稀释倍数为 1 000 倍。本实验结果表明用样品稀释液对含 MTCS 的动物血清做不同 (1:125~1:2 000) 稀释后,当稀释倍数在 1:1 000 以内时稀释度对实测值影响波动不大 (期望指数在 90.4%~

94.4%),不影响测定的准确度。经方法学验证,新建立的测定方法符合药动学要求^[6]。据文献报道^[4],猕猴 iv GLQ223 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后,药物在体内的消除半衰期 $t_{1/2\beta}$ 为 (3.7 ± 1.5) h。本实验结果显示,猕猴 iv MTCS 220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后,药物在体内的消除半衰期 $t_{1/2\beta}$ 为 (3.8 ± 1.4) h。说明 MTCS 与天然的天花粉蛋白的体内过程基本一致。

References:

- [1] Yeung H W, Ng T B. Chemical and biological characterization of the galactose binding lectins from *Trichosanthes kirilowii* root tubers [J]. *Int J Pept Protein Res*, 1986, 27 (2): 208-220.
- [2] Kahn J O, Gorelick K J, Gatti G, et al. Safety, activity, and pharmacokinetics of GLQ223 in patients with AIDS and AIDS-related complex [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(2): 260-267.
- [3] Zhao J, Ben L H. Anti-HIV Agent trichosanthin enhances the capabilities of chemokines to stimulate chemotaxis and G protein activation, and this is mediated through interaction of trichosanthin and chemokine receptors [J]. *J Exp Med*, 1999, 190(1): 101-111.
- [4] Gatti G, Kahn J O. Pharmacokinetics of GLQ223 in rats, monkeys, and patients with AIDS or AIDS-related complex [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35 (12): 2531-2537.
- [5] Zhang Y P. *Pharmacology Experiments* (药理学实验) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.
- [6] Liu C X, Wei G L, Li Q S. Methodology studies of validation for bioanalysis in studies of pharmacokinetics and bioavailability [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet*, 2001, 1(4): 279-286.

原花青素对 β -淀粉样肽 25-35 诱导 PC12 细胞 par-4 和 bcl-2 基因表达的影响

梅寒芳¹, 谢朝阳², 杨红¹, 祝其锋^{2*}

(1. 广东药学院生物化学教研室, 广东广州 510006; 2. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

摘要:目的 探讨原花青素(PC)对 β -淀粉样肽($A\beta_{25-35}$)诱导凋亡 PC12 细胞 par-4 和 bcl-2 基因 mRNA 和蛋白表达的影响。方法 采用 MTT 比色法分析细胞存活率, Hoechst 33258-PI 荧光染色法检测细胞凋亡, RT-PCR 方法检测 PC12 细胞 par-4 和 bcl-2 基因 mRNA 的表达, Western blotting 检测 PC12 细胞 Par-4 和 Bcl-2 蛋白表达。结果 不同剂量(5、10、20、30 mg/L) PC 预处理 PC12 细胞 1 h 可剂量依赖性对抗 $A\beta_{25-35}$ 引起的细胞凋亡, 提高 PC12 细胞的存活率, 减少 $A\beta_{25-35}$ 引起的 PC12 细胞核固缩、凝聚和碎裂, 降低 par-4 基因 mRNA 表达及蛋白表达, 增加 bcl-2 基因 mRNA 表达及蛋白表达。结论 PC 可剂量依赖性对抗 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞的毒性作用, 其机制可能与下调凋亡基因 par-4 和上调抗凋亡基因 bcl-2 表达有关。

关键词:原花青素(PC); $A\beta_{25-35}$; PC12 细胞; 细胞凋亡; par-4; bcl-2

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)03-0405-04

Effect of procyanidins on gene expression of par-4 and bcl-2 in PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$

MEI Han-fang¹, XIE Zhao-yang², YANG Hong¹, ZHU Qi-feng²

(1. Department of Biochemistry, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006, China; 2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of procyanidins (PC) on mRNA and protein expression of par-4 and bcl-2 genes in PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$. **Methods** Cell survival rate was evaluated by MTT assay and apoptosis was analyzed by Hoechst 33258-PI fluorescence staining. The expressions of mRNA and protein for par-4 and bcl-2 were tested by RT-PCR and Western blotting. **Results** Pretreatment with different concentrations of PC (5, 10, 20, and 30 mg/L) for 1 h increased the survival rate of PC12 cell in a dose-dependent manner. PC prevented the PC12 cells nuclei from shrinkage, condensation, and cleavage induced by $A\beta_{25-35}$. PC decreased the expression of par-4 mRNA and protein, and increased the expression

收稿日期: 2005-06-14

基金项目: 广东省重点学科重点项目资助(9808)

作者简介: 梅寒芳(1977-), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士, 助教, 主要从事衰老生化研究。

Tel: (020) 89239472 13602463964 E-mail: meihf37@163.com

* 通讯作者 祝其锋 Tel: (0759) 2388850