

土鳖虫活性肽 LL8 在大鼠体内的药动学及药效学研究

董萍萍^{1,2}, 张加余¹, 魏永利³, 兀琦¹, 徐静², 李华健², 代龙^{1*}, 王少平^{1*}

1. 滨州医学院药学院, 山东 烟台 264003

2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250300

3. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250300

摘要: 目的 研究土鳖虫活性肽 LL8 在正常大鼠体内的药动学, 并考察 LL8 对高脂血症大鼠模型的影响。方法 采用异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 对 LL8 进行 N 端标记 (FITC-LL8), SD 大鼠随机分为 FITC-LL8 高、低剂量 (10、5 mg/kg) 组, 各给药组 im 相应药物, 于不同时间点眼眶取血, 采用 EnSpire 多标记微孔板检测酶标仪, 辅以 DAS 2.0 药动学数据处理软件, 以偏最小二乘法为计算原则, 根据药动学理论得出 FITC-LL8 在 SD 大鼠体内的药动学变化。SD 大鼠随机分为对照组、模型组、辛伐他汀 (200 mg/kg) 组、土鳖虫 (3 g/kg) 组和 LL8 高、低剂量 (50、25 mg/kg) 组, 采用高脂饲料诱导建立高脂血症大鼠模型, 各给药组 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 3 周, 检测各组大鼠血浆中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglycerides, TG) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平; 检测各组大鼠肝脏组织中 TC 和 TG 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠肝组织病理变化。结果 高、低剂量 LL8 在 SD 大鼠体内的代谢趋势相似。与对照组比较, LL8 组大鼠血浆中 TG、TC 和 LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$), 肝脏组织中 TG、TC 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。模型组大鼠肝脏组织内出现明显脂肪空泡与脂滴, 各给药组大鼠肝脏脂肪变性明显改善。结论 LL8 在 SD 大鼠体内半衰期较短, 且能够抑制大鼠肝脏脂肪堆积, 具有调血脂作用。

关键词: 土鳖虫活性肽; LL8; 肽序分析; 异硫氰酸荧光素; 高脂血症

中图分类号: R285.5, 285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)15-4607-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.019

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bioactive peptide LL8 from *Steleophaga plancyi* in rats

DONG Ping-ping^{1,2}, ZHANG Jia-yu¹, WEI Yong-li³, WU Qi¹, XU Jing², LI Hua-jian², DAI Long¹, WANG Shao-ping¹

1. School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

2. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China

3. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetics of bioactive peptide LL8 from Tubiechong (*Steleophaga plancyi*) on normal rats and effect of LL8 on hyperlipidemia rats. **Methods** Fluorescein isothiocyanate (FITC) was used for N-terminal labeling of LL8. SD rats were divided into high-, low-dose FITC-LL8 (10, 5 mg/kg) group, rats were im corresponding drugs, blood was taken at different time; EnSpire multi-label microplate inspection system, DAS 2.0 pharmacokinetic data processing software and partial least square calculation principle were used to calculate the pharmacokinetic changes of FITC-LL8 in SD rats. SD rats were randomly divided into control group, model group, simvastatin (200 mg/kg) group, *S. plancyi* (3 g/kg) group, high- and low-dose LL8 (50, 25 mg/kg) groups, high fat feed-induced rat models of hyperlipidemia were established. Rats in each administration group

收稿日期: 2020-12-17

基金项目: 山东省青创人才引育团队——中药复杂体系作用模式解析创新研究团队项目 (10073004); 烟台市校地融合发展中药大健康产业化平台项目 (2019XDRHXMP18); 滨州医学院高层次人才科研启动基金资助项目 (2019KYQD05, 2019KYQD06, BY2018KYQD11); 名贵中药资源可持续利用能力建设项目 (2060302-1907-08); 山东省中药材及饮片标准研究项目 (2020-004, 2020-201, 2020-202, 2020-203, 2020-204)

作者简介: 董萍萍, 硕士研究生, 从事中药制剂学研究。Tel: 17864191173 E-mail: 17864191173@163.com

***通信作者:** 王少平, 博士, 讲师, 从事中药炮制与中药药性理论研究。Tel: (0535)6913718 E-mail: wsp.0104@163.com

代龙, 硕士, 博士生导师, 从事中药制剂学研究。Tel: 13156189167 E-mail: 2665275709@qq.com

were ig corresponding drugs once a day for 3 weeks. Levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in plasma of each group were measured; Levels of TC and TG in liver tissues of rats in each group were detected; Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes of liver tissues of rats in each group. **Results** Metabolic trends of SD rats in high- and low-dose LL8 group were similar. Compared with control group, levels of TG, TC and LDL-C in plasma of rats in LL8 group were significantly reduced ($P < 0.05$), levels of TG and TC in liver tissue were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). Obvious fat vacuoles and lipid droplets were appeared in liver tissues of rats in model group, and liver steatosis of rats in each administration group was significantly improved. **Conclusion** LL8 has a short half-life in SD rats, which can inhibit the accumulation of fat in liver of rats, and has the effect of regulating blood lipids.

Key words: bioactive peptide from *Steleophaga plancyi*; LL8; peptide sequencing; fluorescein isothiocyanate; hyperlipidemia

土鳖虫，又称土元，为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 或冀地鳖 *Steleophaga plancyi* (Bolony) 的雌虫干燥体，主要用于治疗跌打骨折、血瘀密闭等症，中医临床定义其为破血逐瘀、续筋接骨之要药^[1]。现代药理学研究表明，土鳖虫具有抗血栓、调血脂、抗肿瘤、免疫调节、抗氧化等作用^[2-5]。鉴于土鳖虫传统的口服给药特点及人体消化道对蛋白质药物的消化吸收原理，本课题组前期采用胃蛋白酶和胰蛋白酶复合酶系对土鳖虫进行仿生酶解，经过除盐、超滤、纳滤、DA201-C型大孔吸附树脂、葡聚糖凝胶 G-25 色谱、反相高效液相色谱以及半制备液相色谱等技术分离纯化后，获得纤溶活力最强的土鳖虫活性肽组分 F2，且 F2 具有改善急性血瘀模型大鼠血液流变学指标、调节血脂和血液因子水平的作用^[2,6]。

药动学是反映药物在机体内吸收、分布、代谢、排泄全过程，并运用数理知识和方法论阐述血药浓度变化的综合知识体系^[7]。随着现代分析设备的普及与测试方法的更新，蛋白或活性肽类药物在机体内的变化也能够被反映出来，如人体信使因子谷胱甘肽在体内的分布和衰老的研究，可以借助 ¹²³I、²H、¹³C 等放射性同位素标记示踪其活动规律^[8-11]；藻酸双酯钠等多糖类药物的多羟基酚酸类结构特征，可以采用罗丹明、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 和溴酚蓝等有色极性溶剂进行络合标记^[12]，进而基于络合物发色光转移的原理运用紫外分光光度法、荧光分析方法进行分析，得出其药动学变化规律。因此，采用标记示踪技术可以实现蛋白或活性肽类药物的体内分析^[13]。

本课题组前期研究表明，土鳖虫活性肽 F2 组分具有调血脂活性，但其所含单体活性肽序列以及体内药理作用尚未明确。本研究采用基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱 (MADIL-TOF/TOF-MS) 对前期纯化得到的土鳖虫单体活性肽进行肽序

鉴定，对其中含量最高的活性肽 LL8 用 FITC 标记后进行药动学研究，并进行 LL8 的调血脂作用研究。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，6 周龄，体质量 (200 ± 10) g，购自山东省朋悦实验动物繁育中心，动物许可证号 SCXK (鲁) 20190003。动物饲养于 SPF 级实验动物中心，温度 22~26 °C、相对湿度 (50 ± 2)%。动物实验经山东中医药大学伦理委员会批准 (批准号 SDUTCM20190515001)。

1.2 药材

土鳖虫 (批号 20190107) 购自山东省长清土元养殖场，经山东中医药大学代龙教授鉴定为鳖蠊科冀地鳖 *S. plancyi* (Bolony) 的雌虫干燥体。

1.3 药品与试剂

去离子水购自浙江娃哈哈纯净水公司；辛伐他汀 (批号 J20180007) 购自德国 Merck 公司；乙酰 (批号 10009318)、无水乙醇 (批号 20181111) 购自国药集团化学试剂有限公司；水合氯醛 (批号 2018103001) 购自成都市科隆化学品有限公司；总胆固醇 (total cholesterol, TC) 测定试剂盒 (批号 20190811)、三酰甘油 (triglycerides, TG) 测定试剂盒 (批号 20190709)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 测定试剂盒 (批号 20190529) 购自南京建成生物工程研究所有限公司。

1.4 仪器

BPH-9082 型精密恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司)；HH-601 型超级恒温水浴锅 (镇江瑞祥仪器有限公司)；MS104 型十万分之一天平、MS105 型万分之一天平 (梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司)；EnSpire 多模式微孔板检测系统 (珀金埃尔默企业管理上海有限公司，由山东省科学院分析测试中心提供)；TG20W 型台式高速冷冻式离

心机 (博科精密仪器有限公司); KQ2200DV 型超声振荡仪 (杭州法兰特超声波科技有限公司); Aμtoflex II 型 MADIL-TOF/TOF-MS (德国布鲁克公司); 电子显微镜 (日本尼康公司)。

2 方法与结果

2.1 LL8 氨基酸序列分析与结构预测

采用 MADIL-TOF/TOF-MS 对本课题组前期经分离纯化得到的土鳖虫活性肽组分 F2^[9] 进行氨基酸序列分析。LL8 二级质谱图见图 1, 经解析, 其肽序为 LAPAPGTL, 即亮氨酸-丙氨酸-脯氨酸-丙氨酸-脯氨酸-甘氨酸-苏氨酸-亮氨酸, 命名为 LL8。

采用 pepdraw (<http://pepdraw.com/>)、PEP-

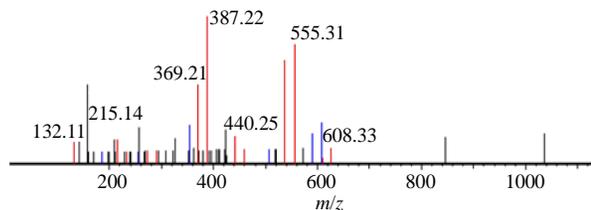


图 1 LL8 二级质谱图

Fig. 1 Secondary mass spectrum of LL8

FOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) 在线对 LL8 进行分子结构和构型预测 (图 2), 等电点为 5.58, 亲水指数为 33.806 72 kJ/mol, 水溶性较好; 空间结构存在 5 个 α 折叠。

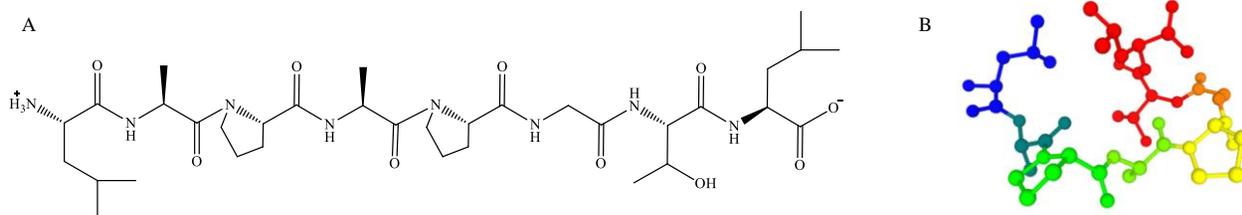


图 2 LL8 氨基酸序列 (A) 及空间结构预测 (B)

Fig. 2 Prediction of amino acid sequence (A) and spatial structure (B) of LL8

2.2 固相合成与荧光标记

将分析出的肽段序列委托上海吉尔生物科技有限公司进行固相合成, 其质量分数为 99.5%。将合成的 LL8 活性肽委托上海摩尔生物科技有限公司采用 FITC 对 LL8 活性肽进行 N 段修饰, 修饰后多肽序列为 FITC-{acp}-Leu-Ala-Pro-Ala-Pro-Gly-Thr-Leu, 质量分数 >95%, 其色谱图见图 3。

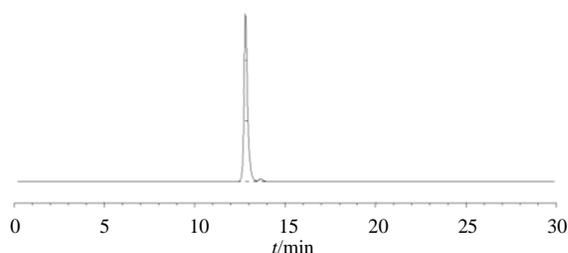


图 3 FITC-LL8 纯度检测

Fig. 3 Purity test of FITC-LL8

2.3 LL8 在正常大鼠体内的药动学研究

2.3.1 血浆样品的制备 SD 大鼠乙醚麻醉后, 眼眶取血置肝素钠抗凝管中, 2 次/d, 每次 2 mL, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上层血浆并合并, 加入等体积十二烷基硫酸钠溶液 (0.1 mol/L) 增敏, 作为空白血浆溶液备用。

2.3.2 方法学考察

(1) 线性考察: 精密称取 FITC-LL8 10 mg, 采用空白血浆溶解, 制备成一系列不同质量浓度的 FITC-LL8 血浆溶液, 以 490 nm 为激发波长, 525 nm 为发射波长, 采用酶标仪测定吸光度 (A) 值。以空白血浆溶液 A 值作为空白, 以质量浓度为横坐标 (X), A 为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到回归方程为 $Y = 2\ 760.9 X + 464.63$, $R^2 = 0.999\ 1$ 。FITC-LL8 在 0.195 3~50.000 0 $\mu\text{g/mL}$ 具有良好的线性关系, 定量限为 0.195 3 $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 日间、日内精密考察: 精密称取 FITC-LL8 适量, 用空白血浆溶解, 分别配制成质量浓度为 50.0、25.0、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 标记为 LL8 高、中、低 3 个质量浓度。采用酶标仪测定 A 值, 各质量浓度样本平行测定 6 次并连续测定 5 d, 计算 3 个质量浓度的日内精密度及日间精密度。结果显示, LL8 3 个质量浓度的日内精密度 RSD 值分别为 0.28%、0.74%、1.08%, 日间精密度 RSD 值为 1.99%、1.21%、1.87%。

(3) 准确度考察: 精密称取 FITC-LL8 适量, 以空白血浆溶解, 分别配制成质量浓度为 50.0、25.0、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 标记为 LL8 高、中、低

3个质量浓度。采用酶标仪测定A值,平行测定3次,计算各溶液的回收率。结果显示,LL8 3个质量浓度的回收率分别为100.23%、99.03%、101.23%,RSD值分别为1.03%、0.34%、0.57%。

(4) 稳定性试验:精密称取FITC-LL8,加入空白血浆配制成质量浓度为50 μg/mL的溶液。采用酶标仪在0、60、180、240、600、720 min对溶液进行测定,记录各时间点下样品的A值,计算RSD值为0.199%,表明血浆稳定性良好。

(5) 加样回收率试验:取FITC-LL8,加入1 mL大鼠新鲜血液,配制6份质量浓度为50 μg/mL的溶液。充分混匀后,按“2.3.1”项下方法处理,采用酶标仪测定A值。结果显示,加样回收率为97.63%~100.15%,平均加样回收率为99.29%,RSD值为0.88%。

(6) 反复冻融条件下的含量变化:取FITC-LL8,溶于5 mL空白血浆,配制成质量浓度为25 μg/mL的溶液,测定A值;于-80 °C超低温冰箱存放15 d后,测定A值;再于-80 °C超低温冰箱放置15 d后,测定A值。结果显示,经过2次冻融后,第15天和第30天3次测定结果的RSD值分别为0.08%、0.21%,表明FITC-LL8不会在反复冻融下发生荧光减弱现象。

2.3.3 药动学研究 12只SD大鼠适应性饲养7 d,实验前禁食12 h,自由饮水。大鼠随机分成FITC-LL8高、低剂量(10、5 mg/kg)组,每组6只;各给药组im相应药物,于不同时间点采集血液,按“2.3.1”项方法处理,采用酶标仪测定A值。以时间为横坐标(X),血药浓度为纵坐标(Y),绘制血药浓度-时间曲线。采用DAS 2.0软件结合最小二乘法计算药动学参数,以非房室模型分析法进行数据分析;采用SPSS 26.0软件对药动学结果进行统计学分析;Graphpad Prism 8.0.2软件绘制曲线图。FITC-LL8血药浓度-时间曲线见图4,主要药动学参数见表1。

2.4 LL8对高脂血症大鼠的调脂作用研究

2.4.1 高脂血症模型的制备 48只SD大鼠适应性饲养7 d,随机分为对照组、模型组、辛伐他汀(200 mg/kg)组、土鳖虫(3 g/kg)组和LL8高、低剂量(50、25 mg/kg)组,每组8只。对照组大鼠给予普通饲料,其余各组给予高脂饲料。第45天于20:00时禁食,第46天8:00时各组大鼠眼眶取血1 mL,测定血浆中TC和TG水平,若模型组与对照组之间

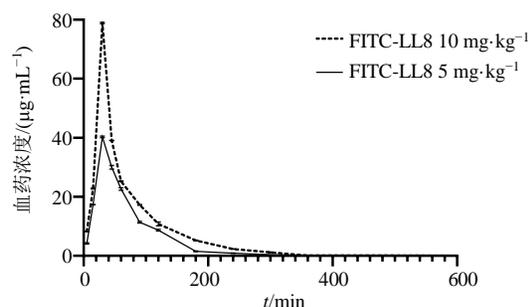


图4 正常大鼠im FITC-LL8的药-时曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 4 Drug-time curve of im FITC-LL8 in normal rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表1 FITC-LL8在正常大鼠体内的主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

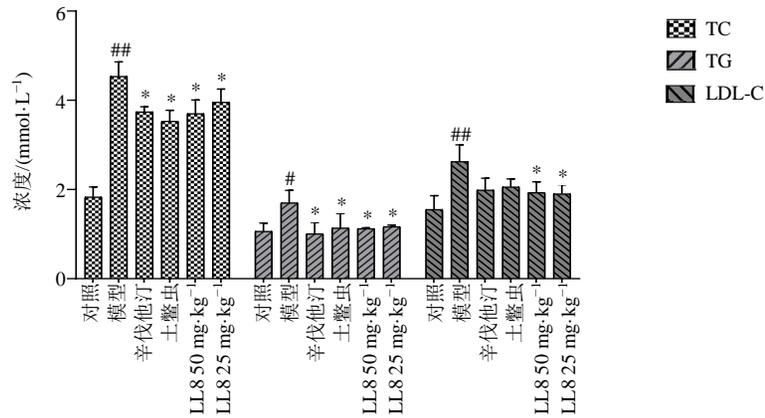
Table 1 Main pharmacokinetic parameters of FITC-LL8 in normal rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	FITC-LL8	
		10 mg·kg ⁻¹	5 mg·kg ⁻¹
$t_{1/2}$	min	37.89 ± 1.49	34.97 ± 3.11
$AUC_{0 \sim \infty}$	μg·mL ⁻¹ ·min ⁻¹	4 082.60 ± 34.83	2 007.30 ± 19.06
$MRT_{0 \sim \infty}$	min	79.15 ± 4.31	72.60 ± 3.43
CL/F	mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	3.65 ± 0.33	4.26 ± 0.19
V/F	mL·kg ⁻¹	316.34 ± 5.29	307.28 ± 3.11
C_{max}	μg·kg ⁻¹	78.86 ± 0.23	40.24 ± 0.35
t_{max}	min	30.00	30.00

有显著性差异,则确定高脂血症大鼠模型制备成功。

2.4.2 给药 辛伐他汀溶于0.9%氯化钠溶液,配制成质量浓度为4 mg/mL的溶液;土鳖虫溶于0.9%氯化钠溶液,配制成质量浓度为0.6 g/mL的溶液;LL8溶于0.9%氯化钠溶液,分别配制成质量浓度为10、5 mg/mL的溶液。造模成功后,各给药组ig 2 mL相应药物,对照组和模型组ig等体积0.9%氯化钠溶液,1次/d,连续3周。

2.4.3 LL8对高脂血症大鼠血浆中TC、TG和LDL-C水平的影响 给药结束后,大鼠禁食12 h,不禁水,ip 10%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,置肝素钠抗凝试管中,3500 r/min离心10 min,取上层血浆,按试剂盒说明书检测大鼠血浆中TC、TG和LDL-C水平。如图5所示,与对照组比较,模型组大鼠血浆中TC、TG和LDL-C水平均显著升高($P < 0.05, 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血浆中TC和TG水平均显著降低($P < 0.05$),LL8各剂量组大鼠血浆中LDL-C水平显著降低($P < 0.05$)。



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as belows

图5 LL8对高脂血症大鼠血浆中TC、TG和LDL-C水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of LL8 on levels of TC, TG and LDL-C in plasma of hyperlipidemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.4.4 LL8对高脂血症大鼠肝脏组织中TC和TG水平的影响 大鼠脱颈椎处死,取肝脏组织,加入甲醇-氯仿(2:1)混合溶剂制成5%的匀浆液,按试剂盒说明书检测大鼠肝脏组织中TC和TG水平。如图6所示,与对照组比较,模型组大鼠肝脏TC和TG水平明显升高($P < 0.05, 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠肝脏TC和TG水平均显著降低($P < 0.05, 0.01$)。

2.4.5 LL8对高脂血症大鼠肝脏组织病理变化的影响 取各组大鼠肝脏组织,于4%多聚甲醛溶液中固定,梯度乙醇脱水后包埋并切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,于显微镜下观察肝脏组织中脂肪变性情况^[14-16]。如图7所示,对照组大鼠肝脏组织结构正常,染色均匀分布,细胞排列整齐清晰,质

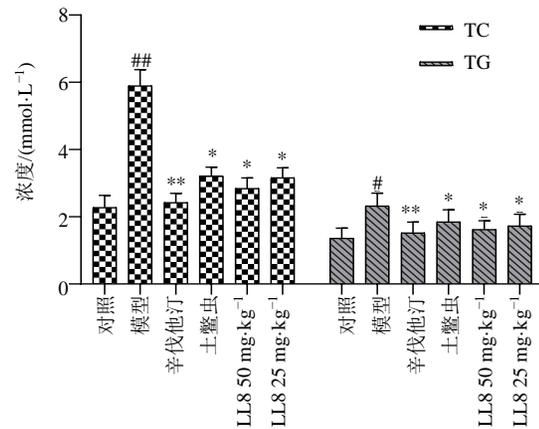


图6 LL8对高脂血症大鼠肝脏TC和TG含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of LL8 on levels of TC and TG in liver of hyperlipidemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

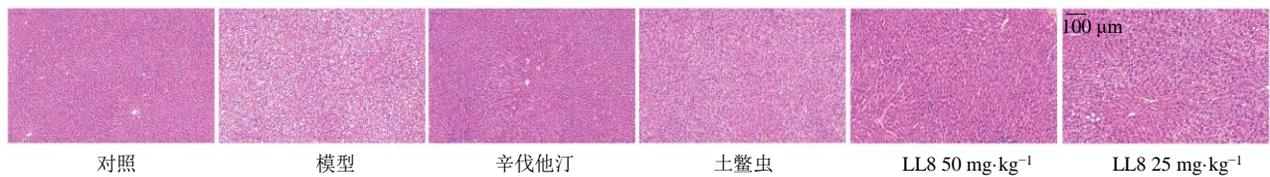


图7 LL8对高脂血症大鼠肝脏病理变化的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 7 Effect of LL8 on pathological changes of liver in hyperlipidemia rats (HE, $\times 100$)

核均匀,肝窦清晰,偶有极细微脂肪颗粒;模型组大鼠肝脏组织发生脂肪变性,细胞排列紊乱,细胞核被挤压于细胞一侧,细胞间隙与细胞质之间具有较多脂肪滴,出现了脂质沉积,且有大小不等的脂肪空泡;与模型组大鼠相比,辛伐他汀组与LL8高剂量大鼠肝细胞排列明显改善,肝窦结构清晰,无明显脂滴,肝细胞受损情况显著改善;LL8低剂量

组肝细胞的结构中脂滴数量显著减少,细胞排列明显改善,但仍见脂质空泡;土鳖虫组大鼠肝细胞肿胀程度较模型组轻,仍见脂质空泡,脂滴多分布于细胞间隙,细胞质中脂滴显著减少。

3 讨论

目前阿加曲班^[17]、利拉鲁肽^[18]等活性肽类药物的主要给药方式为iv,活性肽类药物在胃肠道内易

被消化酶酶解再次形成小分子肽, 导致活性肽结构破坏而失去药效。因此, 本研究通过 im 土鳖虫活性肽 LL8, 从而减少肠道未知因素带来的实验误差。高脂饮食是诱发高脂血症的主要因素, 本研究采用喂食高脂饲料成功诱导了高脂血症模型大鼠, 结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠血浆中 TC、TG 和 LDL-C 水平明显升高, 同时高脂饲料的长期摄入导致进入大鼠肝脏的脂质物质过多, 超过肝脏代谢能力, 导致肝脏脂类代谢失衡, 造成肝脏内 TC 和 TG 水平升高; LL8 能够降低高脂血症大鼠血浆中 TC、TG 和 LDL-C 水平以及肝脏中 TC 和 TG 水平; LL8 能够显著改善肝组织脂肪变性与肝脏病变, 减少肝脏脂滴与脂质空泡, 表明 LL8 可以改善高脂血症大鼠血脂紊乱情况, 且具有较强的肝脏保护作用。

本研究采用荧光素标记示踪方法对 LL8 进行药动学研究, 结果显示, 高、低剂量 LL8 在正常大鼠体内的半衰期相近, 属于快速代谢型药物。活性肽药物 iv 时半衰期短的原因主要为: ①体内多组合蛋白酶对活性肽药物进行急速水解, 导致血药浓度骤降; ②基于“相似相容”原理, 活性肽类药物因与机体成分相似, 较其他植物性成分代谢速度快, 引起半衰期短^[19-20]。目前主要通过末端修饰、形成环肽及螺旋结构修饰、物理包裹等^[21-22]方法, 从而解决活性肽类药物不能长期留存体内的问题。

与植物活性成分药动学研究方法不同, 活性肽类药物没有特定的结构母核, 在目前的常规检测手段下很难被正常计算出来, 借助于发色荧光物质的标记, 并采用先进仪器分析是主流方法^[23-24]。但随着蛋白质组学的普及, 借助于纳流液相色谱仪 Easy LC II 串联高分辨质谱 (Nano Easy LC II-HRMS) 对血液中全肽段进行痕量分析, 可以明确 iv 时活性肽药物的吸收、分布、代谢等情况。

与尿激酶等大分子蛋白类药物相比, LL8 的药物平均滞留时间短^[25], 通过药动学实验结果, 结合药物相对分子质量大小, 后期需对 LL8 进行结构修饰, 在保证药效与安全的用药基础上增加药物在体内保留时间和药物半衰期。为阐明 LL8 在大鼠体内的代谢、排泄与组织分布情况, 课题组后期将对 LL8 在正常 SD 大鼠体内的排泄、代谢及其分布进行系统研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 19-20.

- [2] 姜珊, 王少平, 代龙, 等. 土鳖虫活性肽组分对急性血瘀模型大鼠血液流变学、血脂四项指标及血液因子含量的影响 [J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 175-180.
- [3] 富尧, 张慧明, 许龙, 等. 地鳖虫抗肿瘤成分提取方法的研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(4): 557-559.
- [4] 刘丹, 李兴暖, 秦仲君, 等. 土鳖虫多肽的制备及免疫调节作用研究 [J]. 中药材, 2012, 35(9): 1382-1385.
- [5] 谷崇高, 白若雨, 官佳懿, 等. 地鳖提取物制备和体外抗氧化活性的研究 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(2): 67-74.
- [6] 姜珊, 董萍萍, 李浩然, 等. 土鳖虫活性肽 DP17 对高脂血症大鼠的降脂作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5265-5272.
- [7] Dudkowski C, Karim A, Zhao Z, et al. Single-center evaluation of the pharmacokinetics and safety of the angiotensin II receptor antagonist azilsartan medoxomil in mild to moderate hepatic impairment [J]. *J Clin Pharmacol*, 2018, 58(1): 48-56.
- [8] Sun X N, Heinrich P, Berger R S, et al. Quantification and ¹³C-Tracer analysis of total reduced glutathione by HPLC-QTOFMS/MS [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1080: 127-137.
- [9] 李凤. 外源谷胱甘肽通过 γ -谷氨酰循环促进牛早期胚胎内 GSH 的合成 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [10] 周远大, 何海霞, 王柯静, 等. 口服还原型谷胱甘肽片在大鼠肝、脑、肾组织中的分布及其药动学 [J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(12): 924-928.
- [11] 杨淑群, 周远大, 何海霞, 等. 谷胱甘肽片人体药代动力学及相对生物利用度 [J]. 中国药房, 1999, 10(1): 30-31.
- [12] Li P L, Hao J J, Li H H, et al. Development of an enteric nanoparticle of marine sulfated polysaccharide propylene glycol alginate sodium sulfate for oral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 70(6): 740-748.
- [13] 王秀琴, 李晓辉, 张海港, 等. G 蛋白抑制性多肽-27 药动学测定方法的建立 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(9): 692-695.
- [14] 刘超, 何卫保, 朱桐林, 等. 高脂饮食诱导高脂血症大鼠及不同器官病理变化 [J]. 中国油脂, 2020, 45(9): 81-84.
- [15] 李倩, 罗兴, 闫曙光, 等. 肝脏组织冰冻切片油红 O 染色方法的优化 [J]. 动物医学进展, 2019, 40(9): 58-61.
- [16] 成婧荷, 陈佳佳, 郭嫦娥, 等. 欧李发酵液对高脂血症 SD 大鼠血脂的调控及对肝脏的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 311-316.
- [17] 黄文立, 宫淑杰, 洪全龙. 阿加曲班注射液治疗静脉血栓后 24 h 内进展性卒中患者的临床研究 [J]. 中国临床

- 药理学杂志, 2020, 36(19): 2965-2967.
- [18] 张相林. 新型降糖药利拉鲁肽的临床应用 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(24): 2001-2003.
- [19] 金一, 余传信. 蛋白质及多肽类药物长效化研究进展 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2012, 24(5): 594-597.
- [20] Zorzi A, Middendorp S J, Wilbs J, *et al.* Acylated heptapeptide binds albumin with high affinity and application as tag furnishes long-acting peptides [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 16092.
- [21] 彭晶晶, 王江, 戴文豪, 等. 先导化合物结构优化策略(七): 肽类分子结构修饰与改造 [J]. 药学学报, 2020, 55(3): 427-445.
- [22] 何佳彧, 梁菊, 宣茂松, 等. 提高多肽体内稳定性的有效策略 [J]. 药学学报, 2020, 55(1): 25-32.
- [23] Ramadon D, Courtenay A J, Permana A D, *et al.* A sensitive HPLC-UV method for quantifying vancomycin in biological matrices: Application to pharmacokinetic and biodistribution studies in rat plasma, skin and lymph nodes [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 189: 113429.
- [24] 陈忱, 唐华丽, 马月, 等. 大鼠血浆中枸杞多糖荧光标记物定量分析方法的建立 [J]. 食品科学, 2015, 36(2): 90-95.
- [25] 韩国柱, 何巍, 任开环. 蛋白多肽类药物的药动学特点及其影响因素 [J]. 医药导报, 2003, 22(1): 9-11.

[责任编辑 李亚楠]