

2006 年全国生化与生物技术药物 学术年会论文集

中 国 药 学 会

二 00 六年七月

中国·黄山

中国药学会第 21 届名誉理事长、理事长、副理事长、秘书长、副秘书长名单

名誉理事长：周海钧

理事长：郑筱萸

副理事长：张礼和 邵明立 姚新生 袁天锡 李大魁

秘书长：李少丽

副秘书长：田颂九 刘永久 胡 茵 张晓东

中国药学会第 21 届常务理事会名单 (37 人)

(按姓氏笔画排序)

王福清	毛季琳	冯安国	田颂九	白东鲁	白礼西	任德权	刘永久	杜贵友
李大魁	李少丽	李玉珍	张志荣	杨世民	杨峻山	芮耀诚	肖培根	吴春福
吴晓明	吴满平	张礼和	陆惠兴	陈凯先	陈绍民	邵明立	郑金生	郑梁元
郑筱萸	胡季强	侯惠民	涂用宏	袁天锡	姚新生	桑国卫	裘雪友	蔡年生
管华诗								

中国药学会第 21 届理事会名单 (139 人)

(按姓氏笔画排序)

丁 红	丁德海	才 让	马剑文	马鑫亮	王文芳	王如治	王汝龙	王克新
王明辉	王皖良	王联政	王福清	毛季琳	冯国安	冯帆生	平其能	叶咏年
田颂九	卢 捷	卢彦朝	白东鲁	白礼西	白慧良	刘永久	刘庆华	刘自林
刘宏民	刘明森	刘锡钧	邢 富	吕 奇	朱代平	朱世斌	任德权	向继洲
杜贵友	李大魁	李少丽	李天太	李长龄	李玉珍	李宏建	李志刚	李武臣
李冯琳	李振江	李焕德	杨世民	杨峻山	芮耀诚	肖芳贤	肖培根	邱宗萌
吴 滨	吴秀琴	吴春福	吴晓明	吴滨平	宋瑞霖	张 璇	张礼和	张启国
张志荣	张宝瑞	张泽书	张芝庭	张建平	张树森	张晓东	张淑慧	张象麟
张意龙	张瑞华	陆光照	陆惠兴	陈 羽	陈年代	陈 钢	陈 勇	陈济生
陈德飞	陈凯先	陈绍民	邵明立	郑金生	郑梁元	郑筱萸	郑尚金	林瑞超
尚明远	周筱青	金 彪	金少鸿	金秀范	恽耀红	姜红祥	赵晓鸣	胡 茵
胡季强	侯惠民	贺兴东	涂用宏	高 翔	高其品	郭 涛	郭宗儒	郭月秋
唐人九	郝近大	袁天锡	袁勤生	袁锁中	钱忠直	徐安龙	徐修顺	徐镜人
海新时	姚新生	梁国卫	梁文权	梁智江	唐廷国	黄兆胜	黄泰唐	游枫慧
曾 渝	曾繁典	谢博生	彭司勋	董穗生	韩贵袁	程利勇	袁贵友	蔡鸿生
蔡锡聪	蔡年生	管华诗	潘旭初					

全国生物制药信息中心简介

全国生物制药信息中心前身是全国生化制药情报中心站，是原商业部筹建的，设在南京生物化学制药研究所。根据内贸局发科字[2000]第 147 号文，全国生化制药情报中心站更名为全国生物制药信息中心（以下简称“中心”），迁至北京，设在中国生化制药工业生产力促进中心。

“中心”主要工作是负责我国政府医药行业政策、法规的宣传、贯彻和全国生物制药行业信息建设、信息搜集、处理、提供、市场分析与预测、技术咨询与服务等。一方面，为政府宏观决策提供信息数据与分析报告；一方面，为生物医药企业提供咨询与服务，推动医药企业的信息化建设和电子商务进程。

“中心”主办了《中国生化药物杂志》，同时正在筹建“中国生物药物专家库”和“中国生物药物项目库”，搭建国内外生物医药专家与科研单位、生物制药企业、风险投资企业、金融业等参加的国际化的生物医药高科技投资洽谈平台，目的是促进我国生物医药产业的发展，参与国际竞争。

“中心”下设办公室、财务部、企业管理服务部、研究开发部、国际合作部、市场部等 6 个部门。

“中心”希望与国内外有关协会、企业、科研院所、院校和行业管理部门建立友好往来关系，在科技开发、生产技术管理及市场开发等各个方面进行交流与合作，共同为推进中国生物医药产业的发展做出贡献。

地址：北京复兴门内大街 45 号 118 信箱 邮政编码：100801

电话（传真）：(010) 66095576、66094042

目 录

通过对精神疾病的研究理解药物个性化问题.....	1
肿瘤信号转导及信号转导药物研发.....	2
中国海水养殖鱼类疫苗的发展策略 (摘要).....	3
相对分子质量与剂量对透明质酸口服吸收的影响.....	4
透明质酸磷脂复合物的口服吸收研究.....	9
抗病毒药物的研究开发策略.....	14
RP-HPLC-ELSD 测定芦笋皂苷中菟葵皂苷元的含量.....	19
血清白蛋白与 PTH(1-34) 融合蛋白的克隆、表达及鉴定.....	22
环磷酸胺衍生物对小鼠抗肿瘤作用及其毒性的初步探讨.....	28
酶法制备低聚木糖.....	29
类凝血酶活性的影响因素.....	35
微流控芯片与药物筛选.....	42
五步蛇毒类凝血酶稳定性.....	47
基于病毒巨噬细胞炎性蛋白 11 的多肽设计与活性研究.....	51
西兰花中萝卜硫素制备方法及抗癌作用的研究.....	57
LMWH-SOD 的制备、二级结构分析及其对脑缺血再灌注损伤防治作用机制研究.....	62
羊栖菜多糖的提取、含量测定及组分分析研究.....	64
沙立度胺衍生物的体外抗癌作用及其分子机制研究.....	69
长链烷氧烷基化对若干化合物抗病毒作用的影响.....	70
破伤风抗毒素细菌内毒素检查方法的建立.....	75
Fe-Zn 糖蛋白的制备及其在美容化妆品中的应用.....	79
SARS 冠状病毒 3CL 蛋白酶抑制剂筛选方法.....	83
胸腺肽 $\alpha 1$ 治疗恶性肿瘤的疗效和不良反应的 Meta 分析.....	89
注射用乙酰谷酰胺细菌内毒素检查法的研究.....	92
基因治疗的背景、临床应用和展望.....	95
注射用乙酰谷酰胺冻干曲线的研究.....	99
山茱萸总苷抗炎免疫抑制作用及其机理研究.....	101
槲花总黄酮的提取及抗氧化活性的研究.....	111
提高中药安全性问题思考.....	115
野西瓜成熟果实中多糖的含量测定及高效毛细管电泳分析研究.....	117
庆大霉素生产工艺的实验研究.....	123
乌灵胶囊的临床应用及不良反应.....	128
蛋白质芯片技术及其应用的最新进展.....	132
芦笋多糖提取、单糖组分分析及含量测定.....	137
缩醛磷脂的生物学功能及信号传导机制的研究进展.....	142
药用植物海金沙内生真菌次生代谢物抗菌活性的初步研究.....	146
重组人 TGF- $\beta 1$ 在大肠杆菌中的表达、纯化及其免疫原性测定.....	150

特比澳的药理作用与临床应用	154
3,5-二硝基水杨酸试剂测定硫酸软骨素含量	156
羧甲基壳聚糖及其某些性质研究	159
葛根素对糖尿病大鼠血脂和主动脉 FN 表达的影响	162
重组人活性蛋白 C 的基因克隆、表达载体构建、以及在哺乳动物细胞中的高效表达	168
植物生物转化技术在新药研发中的应用	175
组织芯片技术及其在肿瘤研究中的应用	179
反相高效液相色谱法测定六神丸中脂蟾毒配基的含量研究	182
基因研究与转基因动物的研究进展	185
尝试剂法检测注射用奥美拉唑钠中细菌内毒素	190
vMIP-壳聚糖纳米粒的制备及评价	193
组织因子途径抑制物基因的改造及其在毕赤酵母中的表达	197
克拉霉素漂浮-生物粘附微囊的制备及缓释性能的研究	202
基于药靶的新药发现策略	207
重组人表皮生长因子制剂药理作用与临床应用研究进展	213
白喉类毒素(DT)可控制放微球的研究	216
红曲霉的特点及药用研究	219
网络时代的医院药學信息服务实践	223
低分子量肝素钠口服纳米乳给药系统的研究	226
人源过氧化氢酶在毕赤酵母中的表达筛选与发酵条件优化	232
vMIP-II 联合用药体外抗 HIV-1III B 实验研究	237
新制剂技术和释药系统在生物蛋白多肽药物研究中的应用	242
林蛙抗菌肽体外抑菌活性研究	247
vMIP-II 在毕赤酵母中的表达及其体外活性的研究	252
胸腺五肽长效微球玻璃化温度测定及释放度加速试验方法的研究	257
胰激肽原酶生产工艺的改进	263
CIK 细胞的研究现状与进展	266
应用 SELDI 蛋白质芯片技术对高低转移肺腺癌细胞差异蛋白的初步筛查	270
梔子苷提取工艺优选	277
带有 IL-2 基因佐剂的乙肝病毒 DNA 疫苗构建及其免疫效果的观察	280
十字花科植物中硫代葡萄糖苷的研究	285
注射用胸腺肽热稳定性试验的检测	292
50L 规模中试发酵重组核甘二磷酸激酶 A 工程菌	294
宫颈癌治疗性多肽疫苗诱导强烈的 CTL 效应的作用机制研究	301
四种发根农杆菌对龙胆的遗传转化的研究	307
短棒状杆菌胞壁肽聚糖的实验研究	310
HIV-1 衣壳蛋白结构与功能及其作为新靶标的抑制剂的抑制研究	314
眼氨肽注射液氨基酸的含量测定	317
HPLC 法测定胰岛素原料的效价	319

HCV NS3 蛋白单克隆抗体的制备及其识别区域的分析	322
金葡菌肠毒素 C2 中二硫环缺口的形成研究	327
鲑鱼消化道中蛋白酶提取条件的研究	332
可溶性固定化木瓜蛋白酶的制备及性质研究	335
药物蛋白质组学的技术进展	341
螺旋藻药理研究现状及其在基因工程方面的研究进展	346
噬菌体展示技术在药物开发中的应用	351
化学发光免疫分析及其应用	355
神经元钙通道及钙拮抗剂的抗脑缺血作用	361
甜菜碱的抗肿瘤作用及对 S180 小鼠机体糖代谢过程的影响	365
赤子爱胜蚓纤溶蛋白酶 1 基因 (Efp-1) 的克隆与表达	369
人参皂甙 compound K 的制备、晶体结构及活性研究	377
重组 vMIP-II 鼻腔给药的研究	383
中药注射剂在治疗 SARS 中的应用	387
近红外光谱技术在膳食纤维测定中的应用	391
胸腺肽产品质量状况及指纹图谱应用其质量控制的探讨	395
海洋药物和保健品的发展现状与应用	400
半胱氨酸自组膜免疫传感器的研究	404
紫阳茶叶的历史现状与未来	408
靶向 PKB/Akt 激酶的小分子抑制剂 SYUNZ-16 诱导肿瘤细胞凋亡及其抗癌作用的研究	417
灵芝硒多糖的分离纯化及诱导细胞凋亡的机制研究	418
藤黄新酸对 Be1-7402 细胞的抑制作用及其制初步探讨	419
重组南瓜胰蛋白酶抑制剂 I 的表达参数优化、纯化工艺及其抑瘤活性研究	420
趋化素样因子超家族成员 3 (CKLFSF3/CMTM3) 单克隆抗体的制备以及初步鉴定	421
钒化合物对 I 型糖尿病小鼠的降血糖作用	422

通过对精神疾病的研究理解药物个性化问题

贺林

(上海交通大学 Bio-X 中心, 中国科学院营养研究所)

(<http://www.nhgg.org>)

卫生部公布的资料显示:在我国精神疾病已占医疗总负担的首位,预计到 2020 年仍占据头号负担的位置。为了最终解决这一严重经济和社会问题,我们研究室努力建立起了国内最大的精神疾病分子遗传学研究基地和规范的研究系统,在基础理论和应用方面进行了系统深入的研究。

药物基因组学是刚兴起的遗传学或基因组学用于药物研发并代表发展方向的学科,以期达到医药个性化,减少医疗事故。我们在国内率先介绍并与国际基本同步启动了精神遗传病的药物基因组学研究,特别是结合国情特点提出了“百家姓”与基因药物开发的新思路,初步结果已证实很可能会大大节省医药研发费用。我们在几个方面取得了重要进展:发现在中国汉族人群中 5-羟色胺转运体基因第二内含子 VNTR 多态性分布与高加索人群存在显著差异,并与精神分裂症及单相抑郁症相关,否定了普遍认为的与双相情感障碍间的相关性,为用药提供了指导;与国外大医药公司罗氏和阿斯利康进行了精神疾病药物基因组学合作,加速了这一工作进程并以法律文本方式保护了我国知识产权。

肿瘤信号转导及信号转导药物研发

东方肝胆外科医院 王红阳

随着信号转导网络失控导致肿瘤恶性转化的机制逐渐为人们所认识,越来越多针对特定信号靶点的分子药物被开发和应用,并在肿瘤的靶向治疗中取得了良好的效果。它们的出现意味着肿瘤治疗新纪元的到来,并将最终取代无法区分肿瘤细胞和正常细胞的传统化疗药物。近年来出现了一些针对肿瘤相关酪氨酸激酶的分子靶向药物,并在临床上取得了激动人心的治疗效果。这些药物在特定的肿瘤病人中的应用可明显控制疾病的转归并提高生存率,它们的广泛应用将逐渐提高我们对肿瘤分类和治疗的认知水平,并为进一步开发出新的更有效药物提供人量基础和临床数据。通过不同靶向药物的联合应用以及与传统治疗手段的有效结合,分子靶向药物将有效克服耐药性的产生。另一方面,通过分子分型等新技术的应用将会细分出对特定分子靶向药物治疗有效的肿瘤类型,从而最终实现肿瘤的个性化诊疗。在本节将重点针对两个刚刚得到 FDA 批准上市的小分子激酶抑制剂 Nexavar 和 Sutent 以及临床上已广泛应用的单克隆抗体 Herceptin 进行介绍,旨在让大家了解分子靶向药物研究的基本原理和最新进展,从而对这一前景广阔的新药研究领域有一定的认识和启示。

中国海水养殖鱼类疫苗的发展策略 (摘要)

张元兴

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

规模化、集约化、高密度养殖模式逐渐成为我国海水养殖业发展主流。然而随着海水养殖业的不断稳步发展, 各种病害问题日益突出, 对养殖的产量及成长造成严重影响。今天, 一个全球性关注的挑战已经凸现: 随着越来越多抗生素抗性病原体的出现和发展而导致人类药物防治效力的逐渐丧失, 我们正在进入一个后抗生素时代, 水产食品安全和养殖水环境污染已成为全球性关注的问题。作为符合环境友好、可持续发展战略的经济有效的疾病控制策略和手段, 接种疫苗在现代水产养殖规范中正成为世界各国研究和开发的主要前沿和应用领域。随着现代生物技术的不断发展, 鱼类疫苗的研究开发也同人类和陆地兽用疫苗一样不断地引入了更为尖端的技术和手段, 这主要是以重组 DNA 技术为特征的现代分子生物学技术手段的广泛应用, 各种基因工程疫苗的研究开发已成为当前和今后国际上鱼类疫苗商业化开发的主要前沿和尖端领域。

随着鱼类疫苗的相继商业化许可, 基因缺失减毒活疫苗已经成为当前国际鱼类细菌性病害防治的一个新的商业化开发热点。为了继续消除基因重组疫苗产品的环境安全潜在危害, 无标记基因缺失突变技术发展为近年来国际上构建减毒活疫苗的最先进技术。该开发技术具有如下优点: 1) 开发出的减毒活疫苗不携带抗生素抗性标记和外源基因片段, 消除了对环境潜在的危害; 2) 采用基因定向、多片段缺失突变, 使减毒活疫苗难以毒性回复; 3) 突变的遗传背景清楚, 减毒机理明确, 便于监测和控制疫苗的使用。这些都为无标记减毒活疫苗的安全控制提供了更加有力的保障, 是活疫苗研制开发的新方向。以 DNA 重组和保护性抗原蛋白表达为技术核心的 DNA 疫苗在实验室研究阶段取得了非常理想的结果, 不论是在免疫效力、给药剂量、保护期还是安全性等方面都显示了强人的商业化开发潜质。

我国水产养殖用疫苗开发的整体水平无论是在开发技术还是在商业化品种上, 相对于国际水平还有非常大的差距。对于海水养殖鱼类, 尚未见任何形式的免疫防治用疫苗商品化报道。鉴于国内外的发展现状和形势, 应在以下几个主要方面集中力量, 争取突破: 1) 确立以鱼类疫苗开发为重点的水产养殖病害免疫防治发展战略, 并选择某些重要养殖品种和重大病害病原开展全面而深入的鱼类遗传学、免疫学、流行病害致病机制和病原分子生物学基础研究。2) 鱼类免疫机制和体系不同于人类和陆地动物, 因而不能简单地直接引入和借鉴这些领域疫苗的开发策略和技术。鉴于水产动物的养殖特性, 水产疫苗的开发应以浸泡和口服给药途径作为发展重点和方向。3) 在追踪国际鱼类疫苗前沿领域和技术的基础上有所自主创新, 以一些重大疫病为突破口, 集中力量进行重大疫病尖端疫苗的研制开发, 为我国的水产养殖病害防治技术提供完全自主知识产权保护和现实的生产力, 为我国水产养殖病害防治技术跻身世界先进行列做出积极贡献。4) 在某一病害免疫防治技术成熟的基础上, 应及时将疫苗接种等免疫措施纳入水产养殖的标准化生产操作, 逐步减少乃至最终彻底禁止抗菌药物的使用。

关键词: 水产养殖; 鱼类养殖; 病害防治; 疫苗

相对分子质量与剂量对透明质酸口服吸收的影响

蒋秋燕^{1,2}, 凌沛学^{1,2*}, 黄思玲², 林洪¹, 张天民²

(1. 中国海洋大学生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003;

2. 山东省生物药物研究院博士后科研工作站, 山东 济南 250014)

摘要: 目的 考察相对分子质量与剂量对透明质酸(HA)口服吸收的影响。方法 采用放射免疫法测定大鼠单剂量口服不同 M_r HA后血清中的HA浓度,以梯形法计算各组血清HA浓度-时间曲线下面积净增加值(ΔAUC_{0-12})作为吸收的评价指标。结果 研究发现各HA组血清HA浓度在7 h均有显著性升高,经比较各组的 ΔAUC_{0-12} 可知,在实验所选的4个 M_r 中, M_r 最为 99.2×10^4 的HA吸收效果好。然后选取 M_r 最为 99.2×10^4 的HA考察给药剂量对HA口服后吸收的影响,各组动物血清中HA浓度的检测及比较同上,结果表明在实验所设的4个剂量组中,给药剂量为20 mg/kg体重时吸收效果好。结论 HA口服后的吸收效果与 M_r 和给药剂量相关。推测有一种载体蛋白介导了HA的吸收,且该运送蛋白质与HA的亲合力具有 M_r 相关性。

关键词: 透明质酸; 吸收; 相对分子质量; 剂量

Influence of relative molecular mass and dose on absorption of hyaluronic acid after oral administration in rats

JIANG Qiu-yan^{1,2*}, LING Pei-xue^{1,2}, HUANG Si-ling², LIN Hong¹, ZHANG Tian-min²

(1. Division of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Working Station for Postdoctoral Scientific Research, Institute of Biopharmaceuticals of Shandong Province, Jinan 250108, China.)

Abstract: Purpose To investigate the influence of relative molecular mass and dose on absorption of hyaluronic acid (HA) after oral administration in rats. Methods The serum concentration of HA in rats was determined by radioimmunoassay after taking orally a single dose of various relative molecular mass(M_r) of HA. The ΔAUC_{0-12} of serum HA concentration-time curve was calculated by trapezoidal integration and used as an evaluation index of absorption. Results A significant increase in serum HA concentrations of each M_r group was observed at 7 h, the comparison of ΔAUC_{0-12} confirming that the optimal M_r was 99.2×10^4 among the four M_r . Then the influence of dosage on absorption of HA was investigated, the serum concentration of (HA) in rats was also determined by radioimmunoassay after taking orally a single dose of various dosage of HA which M_r was 99.2×10^4 . The comparison of ΔAUC_{0-12} confirmed that the optimal dosage was 20 mg kg^{-1} among the four dosage groups. Conclusion The data suggested that the effect of absorption might be dependent on M_r and dosage of HA. The absorption may be mediated by a transport protein (HA receptor), and the affinity of HA for this transport protein may also be M_r -dependence.

Key words: hyaluronic acid; absorption; relative molecular mass; dose.

透明质酸(即玻尿酸, hyaluronic acid, HA)是由N-乙酰氨基葡萄糖和D-葡萄糖酸双糖单位以糖苷键交替连接而成的直链高分子黏多糖, M_r 的范围变动较大,一般为 $80 \times 10^4 \sim 500 \times 10^4$ 。研究表明HA的生物功能及使用效果具有 M_r 及浓度相关性^[1,2],故应根据使用目的来选用合适的 M_r 及浓度范

作者简介: 蒋秋燕(1975-),女,内蒙呼盟人,博士研究生,研究方向为食品科学。凌沛学,通讯作者,电话:0531-88937780-1301, E-mail: peixue.ling@bausch.com.

围。日前,通过口服 HA 来预防机体组织老化及维持老龄人群的健康,受到越来越多人的重视与接受,含 HA 的保健美容食品也逐渐增多,使得 HA 口服后能否被吸收、选用何种 M_r 和剂量范围的 HA 用于口服效果好等问题日益受到人们的关注。前文^[3]已报道了 HA 口服后能被机体吸收,本实验将选用不同 M_r HA 给药,进一步就 M_r 及剂量对 HA 口服吸收的影响进行探讨。

1 实验材料

HA1 (M_r 6.8×10^4)、HA2 (M_r 57.4×10^4)、HA3 (M_r 99.2×10^4) 和 HA4 (M_r 217.3×10^4) 均为山东福瑞达生物化工有限公司生产。透明质酸放射免疫分析试剂盒,上海海研医学生物技术中心。

动物:Wistar 大鼠,260~300 g,雌性,山东大学实验动物中心提供。

SN-695B 型放射免疫 γ 测量仪,中国科学院上海原子核研究所日环仪器一厂。

2 实验方法

2.1 实验动物筛选

在大鼠体液中,血中 HA 的浓度很低,许多疾病的发生会导致血中 HA 浓度的升高,因此在实验前要对大鼠进行血中 HA 浓度的测定,筛选出健康的动物。啮齿类动物血清中 HA 浓度范围要比血浆中的低一些^[4],健康大鼠血浆中 HA 范围是 46~260 ng/mL^[5],其血清中 HA 范围还未见报道。本实验中将血清 HA 浓度小于 180 ng/mL (多数正常大鼠血清 HA 的浓度如此)的大鼠用于实验。筛选前禁食(不禁水)12 h。

2.2 实验动物分组及给药

2.2.1 M_r 对 HA 口服吸收的影响 血清筛选合格的大鼠 40 只,随机分 5 组,每组 8 只。分别为生理盐水对照组、HA1 组、HA2 组、HA3 和 HA4 组。大鼠实验前禁食(不禁水)12 h,腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 体重进行麻醉,灌胃给予 HA 剂量均为 20 mg/kg 体重。

2.2.2 给药剂量对 HA 口服吸收的影响 血清筛选合格的大鼠 32 只,随机分为 4 组,每组 8 只。根据“2.2.1”项下的结果,选取吸收较好的 M_r 的 HA 用于实验。大鼠实验前禁食(不禁水)12 h,腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 体重进行麻醉,灌胃给予 HA 剂量依次为 5 mg/kg 体重、20 mg/kg 体重、60 mg/kg 体重和 120 mg/kg 体重。

2.3 血样的采取

各组分别在给药前及药后 1, 2, 4, 7, 10, 12 h 于锁骨下静脉窦处取血约 0.5 mL,置 Eppendorf 管中,待有血清析出时进行离心,制备血清。将血清保存于 -80 °C 冰箱,进行集中测量。

2.4 血清中 HA 含量的测定

2.4.1 原理 透明质酸结合蛋白(HABP)是与 HA 早高度特异亲和的蛋白质,利用 HA 与 HABP 的特异性结合,建立了 HA 放射免疫检测方法(RIA)^[6]。

2.4.2 测定 按照 HA 放射免疫分析试剂盒的说明进行测定,用 RIA 测量与处理程序处理数据

2.5 吸收效果的评价指标

血清中 HA 浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-12h} 越大表示血清中 HA 的量越高,因 HA 为机体血清中固有的成分,当考察 HA 口服后的吸收情况时,应该排除药前值的影响,即可用 AUC_{0-12h} 的净增加值 (ΔAUC_{0-12h}) 来评价吸收效果, ΔAUC_{0-12h} 较大者吸收效果好。本研究主要是考察药后 0~12 h 的吸收情况,因此将各取血点所对应的药理学数据采用梯形法计算 ΔAUC_{0-12h} , 公式为:

$$\Delta AUC_{0-12h} = \text{SUM} \{ (t_{i+1} - t_i) [(C_i - C_{\text{前}}) + (C_{i+1} - C_{\text{前}})] / 2 \}$$

式中 t_i , C_i 分别为 i 的各取血点所对应的时间值和血清中 HA 的浓度。

2.6 数据的处理方法

应用 Excel 软件处理数据, 数据以均值 $\pm$ 标准偏差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $t_{\max}$ 和 $C_{\max}$ 分别为达峰时间和峰浓度的实测值。组内及组间差异比较采用双尾 t 检验。

3 实验结果

3.1 M_n 对 HA 口服吸收的影响

大鼠单剂量口服不同 M_n HA 和生理盐水后血清中 HA 的含量见表 1。

表 1 各组血清中 HA 的含量/(ng/mL) ($n=8, \bar{x} \pm s$)
Tab 1 serum HA concentrations of each group/(ng/mL) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

时间/h	生理盐水	$M_n \times 10^4$			
		6.8 (HA1)	57.4 (HA2)	99.2 (HA3)	217.3 (HA4)
0	100.58 $\pm$ 17.33	135.23 $\pm$ 24.41	122.45 $\pm$ 27.80	126.57 $\pm$ 30.75	124.10 $\pm$ 29.00
1	99.96 $\pm$ 6.17	121.21 $\pm$ 29.55	104.03 $\pm$ 21.25	114.96 $\pm$ 31.06	113.76 $\pm$ 22.71
2	89.48 $\pm$ 37.17	109.80 $\pm$ 20.13	113.11 $\pm$ 57.04	135.07 $\pm$ 23.82	176.93 $\pm$ 46.03 ¹
4	93.05 $\pm$ 29.47	211.42 $\pm$ 54.43 ¹	147.97 $\pm$ 55.85	124.82 $\pm$ 22.52	141.68 $\pm$ 38.30
7	90.82 $\pm$ 32.12	203.69 $\pm$ 28.16 ²	205.31 $\pm$ 79.10 ¹	372.27 $\pm$ 70.73 ³	222.60 $\pm$ 43.66 ²
10	91.06 $\pm$ 30.30	215.89 $\pm$ 59.89 ¹	139.99 $\pm$ 22.87	237.93 $\pm$ 26.16 ³	174.39 $\pm$ 60.09
12	95.34 $\pm$ 28.87	166.17 $\pm$ 35.69	140.50 $\pm$ 60.51	175.47 $\pm$ 33.82	181.88 $\pm$ 62.33

¹与同组药前值相比: ¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$, ³ $P<0.001$

Compared with the value of before administration of the same group: ¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$, ³ $P<0.001$

从表 1 可知, 生理盐水对照组的血清 HA 浓度未出现峰值, 说明口服生理盐水对血清中 HA 浓度没有影响, 用它来配制 HA 的溶液进行实验是合理的。而各 M_n HA 口服后, 血清中 HA 浓度均出现不同程度的峰, 推测是 HA 的吸收峰, 且 $C_{\max}$ 多出现在 7 h 左右。

对实验数据进行统计学分析表明, 与同组药前值相比, 各组在药后 7 h 左右的血清 HA 浓度均有显著性升高。另外, HA1 组在 4 h 与 10 h、HA3 组在 10 h、HA4 组在 2 h 左右的血清 HA 浓度也有显著性升高。推测药后血清 HA 浓度显著性升高的时间不同, 可能与 HA 在消化道的不同部位吸收有关, 也可能由 HA 以不同形式吸收引起的。

表 2 各 M_n 组的 ΔAUC_{0-12h}

M_n	ΔAUC_{0-12h} ng·h·mL ⁻¹
(HA1) 6.8 $\times 10^4$	576.33 $\pm$ 179.95 ^{1,4}
(HA2) 57.4 $\times 10^4$	341.83 $\pm$ 225.67 ²
(HA3) 99.2 $\times 10^4$	1061.22 $\pm$ 291.79 ⁴
(HA4) 217.3 $\times 10^4$	606.65 $\pm$ 266.79 ^{2,3}

与 HA3 组相比: ¹ $P<0.01$, ² $P<0.001$; 与 HA2 组相比, ³ $P<0.01$, ⁴ $P<0.001$

Compared with HA3: ¹ $P<0.01$, ² $P<0.001$; Compared with HA2: ³ $P<0.01$, ⁴ $P<0.001$

经计算, 各组药-时曲线下面积的 ΔAUC_{0-12h} 见表 2。统计学分析表明, 与 HA3 组相比, 其余各组的 ΔAUC_{0-12h} 均显著低于 HA3 组; 与 HA2 组相比, 其余各组的 ΔAUC_{0-12h} 均显著高于 HA2 组; HA1 组与 HA4 组的 ΔAUC_{0-12h} 无显著性差异。

经比较可知, ΔAUC_{0-12h} (HA3) > ΔAUC_{0-12h} (HA4) > ΔAUC_{0-12h} (HA1) > ΔAUC_{0-12h} (HA2)。此结果提示, HA3 的吸收效果最明显, HA2 的吸收效果较差。

综合上述分析可知, 不同 M_n 的 HA 口服后均能被机体吸收, 且能以不同的形式被吸收。吸收

效果与 M_r 相关, 在实验所用的 M_r 范围内, 99.2×10^4 的 HA 吸收效果最好。

3.2 给药剂量对 HA 口服吸收的影响

根据“3.1”项下的 M_r 筛选结果, 选取 HA3 进行剂量实验, 大鼠单次口服各剂量 HA 后血清中 HA 的含量见表 3。

表 3 各剂量组血清中 HA 的含量 (ng/mL) ($n=8, \bar{x} \pm s$)
Tab 3 serum HA concentrations of each dosage group/ (ng/mL) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

时间/h	给药剂量/ (mg/kg 体重)			
	5	20	60	120
0	101.94±9.93	126.57±30.75	99.97±17.08	132.64±29.80
1	163.24±58.09 ¹	114.96±31.06	90.14±26.30	126.88±70.16
2	131.14±36.53	135.07±23.82	187.56±60.45 ²	162.59±111.57
4	148.32±35.89 ¹	124.82±22.52	102.24±27.21	147.42±40.02
7	186.02±36.73 ³	372.27±70.73 ³	214.90±27.80 ³	286.47±104.24 ²
10	204.40±25.39 ³	237.93±26.16 ³	234.37±54.54 ³	223.87±27.18 ³
12	195.04±35.54 ²	175.47±33.82	184.36±54.83 ²	139.76±47.33

与同组药前值相比: ¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$, ³ $P<0.001$

Compared with the value of before administration of the same group: ¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$, ³ $P<0.001$

从表 3 可知, 各剂量 HA 口服后, 血清中 HA 浓度主要在 2 h 及 7 h 左右出现不同程度的峰, 推测是 HA 的吸收峰, 且 C_{max} 多出现在 7 h 左右。对实验数据进行统计学分析表明, 与同组药前值相比, 各组在药后 7 h (120 mg/kg 体重除外) 与 10 h 左右的血清 HA 浓度均有极显著性升高。另外, 5 mg/kg 体重除药后 2 h 外, 其余各时间点血清 HA 浓度都比药前值有显著性升高; 60 mg/kg 体重在药后 2 h 和 12 h 的血清 HA 浓度比药前值有显著性升高。

表 4 各剂量组的 ΔAUC_{0-12h}

Tab 4 ΔAUC_{0-12h} of each dosage group	
给药剂量/ (mg/kg 体重)	ΔAUC_{0-12h} / ng·h·mL ⁻¹
5	822.55±168.08 ¹
20	1061.22±291.79
60	892.39±230.92 ¹
120	772.75±375.73 ¹

与 20 mg/kg 体重组相比: ¹ $P<0.05$ 有显著性差异

Compared with 20 mg/kg·bw dosage group: ¹ $P<0.05$

经计算, 各组药-时曲线下面积的 ΔAUC_{0-12h} 见表 4。统计学分析表明, 20 mg/kg 体重组的 ΔAUC_{0-12h} 高于其余各组, 差异有显著性意义 ($P<0.05$)。

经比较可知, ΔAUC_{0-12h} (20 mg/kg 体重) > ΔAUC_{0-12h} (60 mg/kg 体重) > ΔAUC_{0-12h} (5 mg/kg 体重) > ΔAUC_{0-12h} (120 mg/kg 体重)。此结果提示, M_r 为 99.2×10^4 的 HA, 当给药剂量为 20 mg/kg 体重时, 吸收效果最明显, 当给药剂量为 120 mg/kg 体重时, 吸收效果较差。

综合上述分析可知, M_r 为 99.2×10^4 的 HA, 给药 HA 剂量为 20 mg/kg 体重时, 吸收效果最明显。

4 讨论

4.1 研究 HA 口服吸收指标的选取

HA 为体内存在的天然物质, 准确测定其吸收很困难, 据 HA 在组织中的含量来看, 软结缔组织中 HA 的含量最高, 血中的浓度最低, 因此选取血中 HA 浓度的变化作为研究吸收的指标较灵敏。在研究血清中 HA 浓度时, 取血部位和方法很重要, 血样中不能混入淋巴液, 因为淋巴液中 HA 浓

度要比血清中的高 10 倍以上。

另外, Gegout 等^[7]发现乙醚麻醉后会使人鼠血清中 HA 浓度降低, 我们用戊巴比妥钠麻醉大鼠也出现类似现象, 各组在药后 1 h 内血清中 HA 浓度均不同程度地出现比药前值低的现象, 随着时间的延长, 麻醉作用逐渐减弱, 血清中 HA 浓度逐渐回升趋于平稳。

4.2 M_r 及给药剂量对 HA 口服吸收的影响

实验结果表明, HA 口服后的吸收效果并不是目前普遍认为的 M_r 越小越好, 而是 M_r 为 99.2×10^4 的吸收效果较好。假设 HA 口服后完全是以单糖的形式吸收, 那么在给药剂量相同的情况下, 不同 M_r HA 的吸收效果应该无显著性差异, 但实验表明吸收效果与给药的 M_r 相关, 这就提示 HA 口服后还可能以非单糖的形式吸收。

HA 的受体种类很多, 我们推测, HA 的非单糖吸收形式可能是由巨噬细胞的吞噬及一种运送蛋白质 (HA 受体) 的介导完成, 且这种运送蛋白质与 HA 的亲合力具有 M_r 相关性。

Forrester 等^[8]研究表明, HA 对巨噬细胞吞噬活性的影响具有最强作用浓度, 并不是浓度越高作用越强。我们的实验结果也表明, HA 口服后的吸收效果与给药剂量相关, 剂量过大或过小吸收效果都不好。当剂量较小时, 运送蛋白质尚未达到饱和, 表现在给药剂量与吸收效果的正相关, 但当剂量提高到一定程度后, 使得运送蛋白达到饱和, 剂量的增加对吸收不再有贡献。剂量过大反而会使运送蛋白质的空间结构受阻, 影响 HA 与运送蛋白质的结合, 最终影响 HA 的吸收效果。

4.3 血药数据的处理

对体内药物的药动学过程常采用经典房室模型进行分析, 此方法计算精确, 提供药动学参数齐全, 但由于受数学模型的限制, 对有些数据不能拟合, 如强制拟合会产生一定误差。由于本实验测定的 HA 包括吸收的外源性 HA 与体内再合成的 HA, 药-时曲线不是单峰, 所以实验的结果不宜强制拟合到房室模型, 也不宜采用非房室模型统计矩原理处理数据。

参考文献

- [1] Velebny V, Stancikova M, Svík K, *et al.* Dietetic preparation with hyaluronate for treatment of osteoporosis: WO, 2005032276[P], 2005-04-14.
- [2] Asari A, Kikuchi H. IL-12 expression controlling agents: WO, 02074318[P], 2002-09-26.
- [3] 蒋秋燕, 凌沛学, 黄思玲, 等. 口服透明质酸在大鼠体内吸收机制的研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(23): 1811-1813.
- [4] Yannariello-Brown J, Chapman SH, Ward WF, *et al.* Circulating hyaluronan levels in the rodent: effects of age and diet [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268 (4 Pt 1): C 952-957.
- [5] Reed RK, Lilja K, Laurent TC. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin [J]. *Acta Physiol Scand*, 1988, 134 (3): 405-411.
- [6] 李少林. 核医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 33.
- [7] Gegout P, Drelon E, Jouzeau JY, *et al.* Assay of circulating hyaluronic acid in the rat: study of diurnal variation and effect of anesthesia [J]. *Life Sci*, 1991, 49 (9): PL31-35.
- [8] Forrester JV, Balazs EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate [J]. *Immunology*, 1980, 40 (3): 435-446.

透明质酸磷脂复合物的口服吸收研究

黄思玲^{1,2}, 凌沛学^{1,2}, 姜红祥¹

(1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012;

2. 山东省生物药物研究院 博士后科研工作站, 山东 济南 250108)

摘要: 目的 研究透明质酸磷脂 (HA-PL) 复合物中 PL 对 HA 口服吸收的促进作用。方法 大鼠口服给药后, 于不同时间点取血, 放射免疫法检测血清中 HA 的浓度。结果 与对照组相比, 不同方法制备的不同配比的复合物组血清中 HA 的浓度均有不同程度的增加。结论 采用薄膜分散超声法制备, HA 与 PL 的质量比为 1:3 的复合物对 HA 的口服促吸收作用最强。

关键词: 透明质酸; 磷脂; 复合物; 口服吸收

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 通过口服经消化吸收, 可增加体内 HA 合成的前体, 使皮肤和其他组织中的 HA 合成量增加, 由其皮至表皮增加内源性 HA 的含量, 使细胞活化, 发挥全身作用, 从而延缓皮肤衰老。但是作为生物大分子, 因为其相对分子质量 (M_r) 大, 极性强等原因, 透过生物膜时会受到一定限制^[1], HA 的口服生物利用度受到一定影响。如果能增加 HA 的口服吸收, 将能更好的发挥其美容保健和治疗关节疾病的功能。目前, 利用吸收促进剂是提高药物口服生物利用度的常用方法之一, 如表面活性剂胆酸盐类、脂肪酸类等。吸收促进剂通过改变肠道黏液流变学性质, 提高细胞膜流动性、溶解膜成分、与膜蛋白相互作用, 调节磷脂酶 C 紧密连接物等可能的机制促进吸收^[2,3]。磷脂 (phospholipid, PL) 是具有两亲性的表面活性剂, 也属于脂肪酸类, 具有多种保健功能, 可与 HA 发生相互作用, 通过上述途径促进 HA 的口服吸收。两者还可产生协同作用, 更好的发挥它们美容保健的功效。

我们以 PL 为吸收促进剂, 制备了 HA-PL 复合物, 分别将不同的 HA-PL 复合物样品灌胃给药后, 考察大鼠血清中 HA 的浓度变化, 研究 PL 对 HA 的吸收促进作用, 并为 HA 口服产品的开发提供实验依据。

1 仪器、药品与动物

SN-695B 型放射免疫 γ 测量仪 (中国科学院上海原子核研究所日环仪器厂); LDR4-8.4C 冷冻离心机 (北京医用离心机厂); ZK-801 微型台式真空泵 (上海浦江分析仪器厂); MS1 型漩涡混合器 (德国 IKA 公司); 德国 eppendorf 连续多档分配器; HH-W21-Cu 600 电热恒温水浴锅 (上海医疗器械七厂); MDF-382E 超低温冰柜 (日本三洋电气公司)。

HA (山东福瑞达生物化工有限公司, 批号: 200406151); Lipoid E80 蛋黄卵磷脂 (德国 Lipoid 利宝益公司); HA-PL 复合物 (自制, HA 与 PL 的质量比分别为 1:0.2、1:1 和 1:3, 采用薄膜分散超声法和逆相蒸发法制备); HA 与 PL 的物理混合物 (自制, 物理研磨法制备); HA 放射免疫分析试剂盒 (HA RIA Kit, 上海海研医学生物技术中心)。

Wistar 大鼠, 260~300 g, 雌性, 山东大学医学院实验动物中心提供。

2 动物实验

2.1 实验动物分组

2.1.1 不同配比的 HA-PL 复合物大鼠口服吸收的研究 健康雌性 Wistar 大鼠 40 只, 随机分为 5 组, 每组 8 只, 分别为生理盐水 (NS) 对照组, HA 对照组, HA 与 PL 质量比分别为 1:0.2、1:1 和 1:3 的 HA-PL 复合物组 (均采用薄膜分散超声法制备)。

2.1.2 HA 与 PL 混合物及不同方法制备的复合物大鼠口服吸收研究 健康雌性 Wistar 大鼠 18 只, 随

机分为3组,每组8只,分别为薄膜分散超声法复合物组、逆相蒸发复合物组和物理混合物组,其中HA与PL的质量比均为1:3。

2.2 血样的采取

大鼠实验前禁食(不禁水)12 h,腹腔注射戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉。灌胃给药,HA对照组的剂量为60 mg/kg体重,其余给组的剂量均为相当于HA 60 mg/kg体重。分别在给药后0, 1, 2, 4, 7, 10, 12 h于锁骨下静脉窦处取血约0.5 mL,置Eppendorf管中,待有血清析出时进行离心,取出血清后保存于-80℃冰箱,用HA RIA Kit进行集中测量。

2.3 数据的处理

应用Excel软件处理数据,数据以均值±标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示, $t_{\max}$ 和 $C_{\max}$ 分别为达峰时间和峰浓度的实测值。

血清中HA浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t} 越大表示血清中HA的含量越高,因HA为机体血清中固有的成分,当考察HA口服后的吸收情况时,应该排除药前值的影响,即可用 AUC_{0-t} 的净增加值(ΔAUC_{0-t})来评价吸收效果, ΔAUC_{0-t} 较大者吸收效果好。本研究主要是考察药后0~12 h的吸收情况,因此将各取血点所对应的药动学数据采用梯形法计算 ΔAUC_{0-12h} ,公式为:

$$\Delta AUC_{0-12h} = \text{SUM}\{(t_{i+1}-t_i)[(C_i - C_{\text{药前值}}) + (C_{i+1} - C_{\text{药前值}})]/2\}$$

式中 t_i , C_i 分别为 i 的各取血点所对应的时间值和血清中HA的浓度。

3 实验结果

3.1 不同配比的HA-PL复合物大鼠口服吸收的研究

各组血清中HA的浓度见表1,药-时曲线见图1, ΔAUC_{0-12h} 数据见表2。

表1 大鼠口服不同配比复合物后血清中HA的浓度/(ng/mL) ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

时间/h	NS组	HA组	1:0.2	1:1	1:3
0	115.4±23.8	118.2±9.6	119.9±14.5	87.9±11.6	123.6±26.7
1	103.5±9.4	106.8±15.0	131.0±25.3	92.8±20.6	153.6±24.9
2	105.9±30.2	108.0±24.5	105.2±39.3	79.9±15.7	147.2±44.4
4	107.8±44.9	119.2±19.4	113.0±27.9	83.8±15.1	157.2±29.3
7	95.6±32.8	207.6±25.3	241.3±49.4	231.8±45.1	240.0±41.3
10	109.9±32.2	162.2±29.2	164.0±41.5	191.4±43.0	209.6±49.5
12	103.9±27.6	139.8±54.5	116.7±26.3	156.8±71.4	202.6±43.4

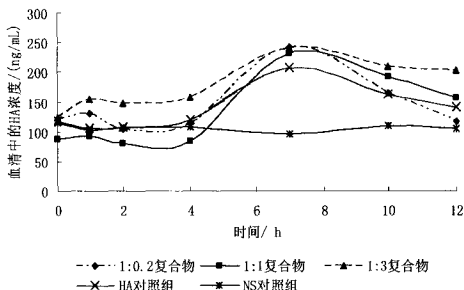


图1 大鼠口服不同配比复合物后的药-时曲线。n=8

从图1中可以看出,相对于NS组,复合物组和HA组在给药后4~12 h均出现一个吸收峰,且HA与PL质量比为1:1和1:3复合物组在该时间段内血清中HA的浓度均高于HA对照组,尤其是1:3复合物组从给药后1 h开始血清中HA的浓度就明显高于HA组和其余两个配比组,1:0.2的复合物组血清中HA的浓度在7 h左右高于HA组。从表2 ΔAUC_{0-12h} 的计算结果中可以看出,利用薄膜分散超声法制备的三个配比复合物组的 ΔAUC_{0-12h} 均高于HA对照组,且 $\Delta AUC_{0-12h}(1:3 \text{ 复合物}) > \Delta AUC_{0-12h}(1:1 \text{ 复合物}) > \Delta AUC_{0-12h}(1:0.2 \text{ 复合物}) > \Delta AUC_{0-12h}(HA)$ 。证明外源性HA口服给药后可以被吸收进入血液,HA与PL形成复合物后,PL可以促进HA的口服吸收,复合物中PL含量越高,对HA的促吸收作用越强。

表2 不同配比复合物的 ΔAUC_{0-12h}

给药组	$\Delta AUC_{0-12h} / (\text{ng} \cdot \text{h/mL})$
1: 0.2 复合物组	437.2 $\pm$ 234.2
1: 1 复合物组	739.7 $\pm$ 221.1*
1: 3 复合物组	777.9 $\pm$ 318.3*
HA 对照组	381.8 $\pm$ 340.8

3.2 HA与PL混合物及不同方法制备的复合物大鼠口服吸收研究

大鼠血清中HA的浓度见表3,药-时曲线见图2, ΔAUC_{0-12h} 数据见表4。其中HA对照组及薄膜分散超声法制备的1:3复合物组的数据为“3.1”中的数据。