

中华眼镜蛇毒细胞毒素 14 的药物动力学 R 996.3

郭慕平、王晴川、刘广芬 (福建医学院, 蛇毒研究室, 福州 350004, 中国)

Pharmacokinetics of cytotoxin 14 from *Naja naja atra* venom

GUO Mu-Ping, WANG Qing-Chuan, LIU Guang-Fen (Laboratory of Snake Venom Research, Fujian Medical College, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT The pharmacokinetics of cytotoxin 14 (CT 14) from *Naja naja atra* venom was studied with biotin-avidin enzyme-linked immunosorbent assay. The plasma concentration-time curve of CT 14 after bolus iv 0.2 mg · kg⁻¹ into rabbits was found to fit a two-compartment open model. T_{1/2} was 5.8 ± 0.6 min and T_{1/2β} was 3.5 ± 0.2 h. A rapid absorption was seen after im injection (0.5 mg · kg⁻¹) to rabbits. The peak level was 260 ± 90 ng · ml⁻¹ and T_{peak} was 13.6 ± 2.4 min. The absolute bioavailability was 34 ± 9%. It was shown that CT 14 was absorbed by gut. The peak level was 75 ± 15 ng · ml⁻¹ after a gastric gavage of 50 mg · kg⁻¹ to rats.

KEY WORDS cobra venoms; cytotoxins; pharmacokinetics; biotin; avidin; enzyme-linked immunosorbent assay

提要 用生物素-抗生物素蛋白酶联免疫吸附测定(BA-ELISA)法研究中华眼镜蛇毒细胞毒素 14 的药物动力学。家兔 iv 0.2 mg · kg⁻¹ 的体内过程符合二室开放模型, T_{1/2α} 为 5.8 ± 0.6 min, T_{1/2β} 为 3.5 ± 0.2 h。家兔 im 0.5 mg · kg⁻¹, C_{max} 为 260 ± 90 ng · ml⁻¹, T_{peak} 为 13.6 ± 2.4 min, 绝对生物利用度为 34 ± 9%。大鼠 ig 50 mg · kg⁻¹, C_{max} 为 75 ± 15 ng · ml⁻¹。

关键词 眼镜蛇毒液类; 细胞毒素; 药物动力学; 生物素; 抗生物素蛋白; 酶连接免疫吸附测定

眼镜蛇毒细胞毒素(cytotoxin, CT)有抗癌活性⁽¹⁾。我们从中华眼镜蛇毒中纯化一种细胞毒素, CT 14, 经动物体内及体外实验证明

对多种肿瘤细胞有较强杀伤作用(待发表)。本文采用 BA-ELISA 法研究该毒素的 3 种不同给药途径的动物体内过程, 提供临床参考。

MATERIALS AND METHODS

中华眼镜蛇(*Naja naja atra*)毒细胞毒素 14 (cytotoxin 14, CT 14), CT 14 特异性抗体, 生物素化抗体, 均由本实验室按前文⁽²⁾方法制备。酶标抗生物素蛋白, 酯化生物素, 牛血清白蛋白为上海生物制品研究所产品。55 孔聚苯乙烯微量反应板, GXM-201 型酶标光度计为四川分析仪器厂产品。3P87 程序由中国药学会数学药理专业委员会编制。

昆明种小白鼠, 19.4 ± s 1.0 g, Wistar 大鼠, 193 ± 21 g, 家兔 1.82 ± 0.09 kg, ♀♂ 并用, 均由本院动物中心提供。

LD₅₀ 测定 小鼠按性别、体重随机分成 8 组, 每组 10 只, iv 等比剂量的 CT 14 0.2 ml · 10 g⁻¹ 体重, 记录 1 wk 内各组小鼠死亡数目, 按简化机率单位法⁽³⁾计算 LD₅₀。

给药和血样采集 家兔 6 只, 给药前 iv 肝素 3125 IU · kg⁻¹ 体内抗凝, 耳中动脉切开取血 0.2 ml 做阴性对照。CT 14 200 μg · kg⁻¹ iv 后 1, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 480, 720 min 由耳中动脉取血 0.2 ml 待测。上述 iv 给药后的家兔, 饲养 2 周, 右腿深部肌肉注射 CT 14 500 μg · kg⁻¹, 给药后 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 480, 720 min 由耳中动脉取血 0.2 ml 待测。另用大鼠 5 只, 实验前禁食 12 h, 自由饮用 5% 葡萄糖生理盐水, iv 肝素抗凝, 断尾取血作阴性对照。CT 14 溶于 NaCl 0.15 mol · L⁻¹ 溶液, 50 mg · kg⁻¹ ig 后 15, 30, 60, 120, 240, 480, 720 min 断尾取血 0.1 ml 待测。

血药浓度测定 采集的血样用 pH 7.4 磷酸缓冲液(PBS) 0.01 mol · L⁻¹ 10 倍稀释, 1500 × g 离心 10 min, 取上清液按 BA-ELISA 法⁽²⁾测定, 每板均同时

制作标准工作曲线, 测定结果由标准曲线求相应浓度。

血药-时间过程数学模型拟合及动力学参数计算

以各组实验动物血药浓度的均数作为主数据, 采用 3P87 程序, 在 IBM 微机上进行血药-时间过程数学模型拟合, 以 F 值、AIC 值^[4]作为模型判别依据, 以最优拟合的血药-时间曲线方程计算每一动物的药动力学参数, 再以实验组为单位作统计处理。

RESULTS

1 LD₅₀ 小鼠 iv CT 14 的 LD₅₀ 按简化机率单位法测得为 0.86 mg · kg⁻¹, 95% 可信限为 0.79-0.93 mg · kg⁻¹。未存活小鼠多数于注毒后 0.5-4 h 内发绀抽搐死亡。

2 CT 14 iv 药物动力学 家兔 iv CT 14 的血药-时间曲线具有二室开放模型特征(Fig 1)。房室模型判别分析表明, 一室模型与二室模型的拟合结果经 F 检验有显著性差异 (P < 0.01), 二室模型拟合的 AIC 值较小, 血药浓度实测值与二室模型拟合值契合良好, 拟合的参数方程式如下:

$$C_p^{iv} = 1156.3 e^{-0.1214t} + 92.7 e^{-0.0033t}$$

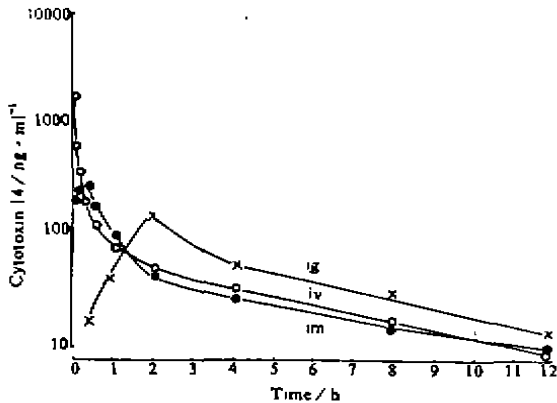


Fig 1. Plasma concentrations of cytotoxin 14 from *Naja naja atra* venom measured with BA-ELISA. iv 0.2 mg · kg⁻¹ or im 0.5 mg · kg⁻¹ in rabbits (n = 6). ig 50 mg · kg⁻¹ in rats (n = 5). $\bar{x} \pm s$.

按二室开放模型计算的各项动力学参数见 Tab 1。

3 CT 14 im 药物动力学 血浆 CT 14 浓度实测值分别用无滞后时间的一级吸收和一级消除的一室模型及二室模型拟合, 拟合结果经 F 检验有显著性差异 (P < 0.001), 二室模型的 AIC 值较小, 用二室模型拟合的参数方程如下:

$$C = 434.9 e^{-0.0337t} + 48.2 e^{-0.0020t} - 483.1 e^{-0.1565t}$$

血药-时间过程见 Fig 1, 各项动力学参数见 Tab 1。

4 CT 14 po 药物动力学 血药-时间过程符合有滞后时间的一级吸收和一级消除的一室模型(Fig 1)。拟合的参数方程如下:

$$C = 191.2 (e^{-0.0036t+0.0066} - e^{-0.0148t+0.2723})$$

各项动力学参数见 Tab 1。

DISCUSSION

本文采用 BA-ELISA 法研究 CT 14 的药物动力学, 结果表明, 家兔 iv CT 14 200 μg · kg⁻¹ 的血药浓度经时过程具有二室开放模型特征, 其 T_{1/2α} 较短, 说明 iv 该毒素后可迅速从中心室向周边室转运和分布 T_{1/2β} 为 3.5 h, 依此估计, 一次 iv 后约 15 h, 血中药物已基本消除。中心室分布容积约占总表现分布容积的 11%, 说明毒素与血浆蛋白等血液成分无特殊亲和力, 而与血管外组织有较强亲和力。

im 给药的药代动力学规律与 iv 给药较一致, 给药后血药浓度迅速上升, 达峰时间 13.6 min, 峰值浓度 260 mg · ml⁻¹, 而后按二室模型消除, 绝对生物利用度为 34%。眼镜蛇细胞毒素易于通过毛细血管壁从血流吸收^[5], 因而, 给药后吸收快, 生物利用度较低可能因毒素与肌肉组织有一定结合力^[6], 肌注后与注射局部组织结合, 以后缓慢释放, 以至其量检测不出。

蛇毒能否口服吸收, 对其临床应用有实际意义。本实验证实, 眼镜蛇细胞毒素口服可以吸收, 但吸收较慢, 吸收甚少。

Tab 1. Pharmacokinetic parameters of cytotoxin 14 after iv 0.2 mg · kg⁻¹ or im 0.5 mg · kg⁻¹ to rabbits (n=6) and ig 50 mg · kg⁻¹ to rats (n=5). $\bar{x} \pm s$.

Parameters	iv	im	ig
A / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	1.2 ± 0.4	0.43 ± 0.14	0.19 ± 0.09
B / $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	93 ± 16	48 ± 28	
α / min^{-1}	0.120 ± 0.013	0.034 ± 0.010	
β / h^{-1}	0.20 ± 0.01	0.12 ± 0.02	
K_a / min^{-1}		0.16 ± 0.03	0.015 ± 0.006
K_{12} / min^{-1}	0.08 ± 0.01	0.018 ± 0.007	
K_{21} / h^{-1}	0.76 ± 0.15	0.35 ± 0.11	
K_{10} / min^{-1}	0.032 ± 0.005	0.012 ± 0.02	
K_e / h^{-1}			0.22 ± 0.04
$T_{1/2\alpha}$ / min	5.8 ± 0.6	22 ± 7	
$T_{1/2\beta}$ / h	3.5 ± 0.2	5.9 ± 0.9	
$T_{1/2K_a}$ / min		4.6 ± 1.1	50 ± 20
$T_{1/2K_e}$ / h			3.3 ± 0.8
T_{lag} / min			18 ± 3
T_{peak} / h		0.23 ± 0.04	2.5 ± 0.4
C_{max} / $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$		260 ± 97	75 ± 15
V_d / $\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	1.7 ± 0.3	9 ± 4	2.6 ± 0.8
AUC / $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$	38 ± 9	33 ± 15	34 ± 6
Cl / $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$	5.6 ± 1.4	17 ± 6	1.5 ± 0.3
F / %		34 ± 9	

REFERENCES

- Iwaguchi T, Takechi M, Hayashi K. Cytocidal activity of cytotoxin from Indian cobra venom and its derivatives against experimental tumours. *Toxicon* 1975; 13 : 101-2.
- Guo MP, Wang QC, Liu GF. The biotin-avidin-ELISA for the cytotoxin purified from *Naja naja atra* venom. *Acta Pharmacol Sin* 1992; 13 : 189-92.
- 孙瑞元. 毒性实验. 见: 徐叔云, 卞如濂, 陈修编. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1982 : 400-10.
- Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinetics Biopharm* 1978; 6 (2) : 165-75.
- Lee CY. Mode of action of cobra venom and its purified toxins. In: Lance L, Simpson editors. *Neurotoxins*. NY: Plenum, 1971 : 21-70.
- Tseng LF, Chiu TH, Lee CY. Absorption and distribution of ¹²⁵I-labeled cobra venom and its purified toxins. *Toxicol Appl Pharmacol* 1968; 12 : 526-35.