

静脉注射尿酸酶多囊脂质体的药代动力学和药效学研究*

邓雪, 何丹, 熊华蓉, 周云莉, 张景劼[△]

重庆医科大学 药物高校工程研究中心 (重庆 400016)

【摘要】 目的 研究尿酸酶多囊脂质体(uricase-multivesicular liposomes, UOMVLs)在大鼠体内的药代动力学,并与游离尿酸酶(uricase, UOX)进行药代动力学和药效学比较。**方法** 采用复乳法制备 UOMVLs,检测 UOMVLs 包封率、粒径和 Zeta 电位。将 12 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 2 组,分别静脉注射 UOMVLs 和 UOX 进行干预治疗,测定给药后不同时间点大鼠血清中尿酸酶的活性,用 DAS 2.1.1 软件进行药代动力学参数计算。另取 24 只雄性 SD 大鼠,模型组采用次黄嘌呤和氧嗪酸钾建立高尿酸大鼠模型($n=6$),UOMVLs 组($n=6$)和 UOX 组($n=6$)分别于建模后 1 h 静脉注射 1 mL (0.47 U/mL)UOMVLs 和游离 UOX,并以正常组($n=6$)为对照,于建模后 1、2、3、5、7、9、12、24、36、48 h 测定大鼠血清中尿酸水平。对其降尿酸作用进行考察。**结果** 制备的 UOMVLs 包封率为 $(63.75 \pm 3.65)\%$,粒径为 $(22.56 \pm 1.70) \mu\text{m}$,Zeta 电位为 $(-41.81 \pm 6.59) \text{mV}$ 。大鼠静脉注射 UOMVLs 和 UOX 后,药时曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)分别为 (498.83 ± 58.85) 和 $(28.49 \pm 9.95) \text{U/L} \cdot \text{h}$;达峰时间($T_{\max}$)分别为 (1.00 ± 0.00) 和 $(0.00 \pm 0.00) \text{h}$;峰浓度($C_{\max}$)分别为 (73.04 ± 6.35) 和 $(31.00 \pm 6.03) \text{U/L}$;半衰期($t_{1/2}$)分别为 (3.49 ± 0.80) 和 $(1.17 \pm 0.33) \text{h}$;UOMVLs 相对于 UOX 的生物利用度为 $(1750.90 \pm 206.56)\%$ 。UOMVLs 和 UOX 药效学特性分析显示,UOMVLs 干预治疗 9 h 大鼠血尿酸水平降至正常组水平,而 UOX 干预治疗 48 h 大鼠血尿酸水平才与模型组一样降至正常组水平。**结论** 将 UOX 制备成 UOMVLs 后 $T_{\max}$ 延后, $t_{1/2}$ 延长,生物利用度明显提高;UOMVLs 比 UOX 更有效降低高尿酸模型大鼠血清中尿酸水平。

【关键词】 尿酸酶 多囊脂质体 药代动力学 药效学

The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous Uricase Multivesicular Liposomes DENG Xue, HE Dan, XIONG Hua-rong, ZHOU Yun-li, ZHANG Jing-qing[△]. *Medicine Engineering Research Center in University, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*

[△] Corresponding author, E-mail: zjqrae01@163.com

【Abstract】 Objective To determine and compare the pharmacokinetics and pharmacodynamics of uricase-multivesicular liposomes (UOMVLs) with free uricase (UOX) in rats. **Methods** UOMVLs were prepared by the double emulsion method and confirmed with its entrapment efficiency, size and Zeta potential. Twelve healthy rats were randomly divided into two groups: one with i. v. injection of UOMVLs, and the other with i. v. injection of UOX. Their serum activity of uricase was assayed. The pharmacokinetic parameters were calculated using software DAS 2.1.1. Another 24 male SD rats were enrolled, the rat model of hyperuricemia was established with hypoxanthine and potassium oxonate, while normal group ($n=6$) was set as control. Injection of UOMVLs (1 mL, 0.47 U/mL), UOX (1 mL, 0.47 U/mL) and nothiy were given 1 h later in UOMVLs group ($n=6$), UOX group ($n=6$) and model group ($n=6$), and their serum uric acid levels were determined 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 36, 48 h after the establishment of hyperuricemia model. **Results** The entrapment efficiency of UOMVLs was $(63.75 \pm 3.65)\%$, with an average particle size of $(22.56 \pm 1.70) \mu\text{m}$ and Zeta potential of $(-41.81 \pm 6.59) \text{mV}$. The pharmacokinetic parameters of UOMVLs and UOX were as follows, respectively: area under time-concentration curve from 0 to infinity time ($AUC_{0-\infty}$) $(498.83 \pm 58.85) \text{U/L} \cdot \text{h}$ and $(28.49 \pm 9.95) \text{U/L} \cdot \text{h}$; time to peak concentration ($T_{\max}$) $(1.00 \pm 0.00) \text{h}$ and $(0.00 \pm 0.00) \text{h}$; peak concentration ($C_{\max}$) $(73.04 \pm 6.35) \text{U/L}$ and $(31.00 \pm 6.03) \text{U/L}$; elimination half-life ($t_{1/2}$) $(3.49 \pm 0.80) \text{h}$ and $(1.17 \pm 0.33) \text{h}$. The relative bioavailability of UOMVLs was $(1750.90 \pm 206.56)\%$. UOMVLs decreased serum uric to normal in 9 h; whereas it took 48 h for the UOX group and the model group to return to normal. **Conclusion** UOMVLs can prolong $t_{\max}$ and $t_{1/2}$ and improve the relative bioavailability. UOMVLs decrease serum uric acid levels in rats with hyperuricemia more effectively than UOX.

【Key words】 Uricase Multivesicular liposomes Pharmacokinetics Pharmacodynamics

* 国家自然科学基金(No. 30973645)资助

[△] 通讯作者, E-mail: zjqrae01@163.com

高尿酸血症是因嘌呤代谢异常或尿酸排泄障碍导致血液尿酸水平升高而引起的疾病。高尿酸血症不仅是导致痛风的主要原因,还与心血管疾病、糖尿

病及肾脏疾病密切相关^[1-3],对人类健康造成威胁。且随着生活水平的提高,高尿酸血症的患病率逐年上升^[4]。尿酸酶(uricase, UOX)在嘌呤代谢途径中有重要的作用,可将尿酸分解成溶解度比尿酸高的尿囊素^[5]。UOX 专一性强、催化效率高,临床应用 UOX 已有 40 多年的历史。但 UOX 作为蛋白类药物存在稳定性差^[6]、半衰期短、需要频繁给药及具有很强免疫原性^[7]等缺点,在医药领域的应用受到一定限制。为了提高 UOX 的活性和生物利用度,本研究制备了尿酸酶多囊脂质体(uricase-multivesicular liposomes, UOMVLs),并考察了大鼠静脉给药后的药代动力学过程及 UOMVLs 对高尿酸大鼠模型的降尿酸作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 尿酸酶(Sigma-Aldrich,批号:SLBC3289);大豆卵磷脂(德国 Lucas Meyer 公司,批号:20120706);胆固醇(广州天马精细化工厂,批号:20110307);三油酸甘油酯(国药集团药业股份有限公司,批号:F20081020);泊洛沙姆 407(南京威尔化工有限公司,批号:20111101);泊洛沙姆 188(南京威尔化工有限公司,批号:20111101);L-赖氨酸(北京鼎国生物技术有限公司,批号:97210230);葡萄糖(重庆博艺化学试剂有限公司,批号:081203)、硼酸(重庆博艺化学试剂有限公司,批号:091103);尿酸(英国 Alfa Aesar 公司,批号:20100B15);硼砂(江苏强盛化工有限公司,批号:20091013);乙醚(重庆川东化工集团有限公司,批号:20130801)。

1.1.2 主要仪器 QL-901 型旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);UV-7504 PC 型紫外分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);TGL-16B 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);Nano-ZS90 型马尔文粒径测定仪(英国马尔文公司);AB204S 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 仪器公司);Bio-Tek ELX800 全自动酶标仪(美国宝特)。

1.1.3 动物 36 只雄性 SD 大鼠,体质量(250±20) g,由重庆医科大学动物实验室提供,动物合格证号:SYXK(渝)2012-0001。

1.2 方法

1.2.1 UOMVLs 的制备 采用复乳法制备 UOMVLs^[8,9],取处方量的卵磷脂、胆固醇、三油酸

甘油酯溶于乙醚作为油相(O)。分别称取适量的葡萄糖溶于 pH8.5 硼酸盐缓冲液得到 3% 的葡萄糖溶液和 4% 的葡萄糖溶液。将含有处方量的 UOX、泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 188 的 3% 葡萄糖水溶液作为内水相(W1),将内水相与油相等体积混合均匀,涡旋 8 min 形成 W/O 型初乳。将初乳加入到含 40 mmol/L L-赖氨酸与 4% 葡萄糖的外水相(W2)中,初乳与外水相的体积比为 1:3,高速分散均质机剪切制成 W/O/W 型复乳,室温下减压旋转蒸发除去有机溶剂,即得 UOMVLs。

1.2.2 UOMVLs 包封率的测定 采用间接法^[10]测定 UOMVLs 的包封率。吸取适量 UOMVLs,离心 5 min 后取上清液,加入氯仿混合均匀。取水层溶液,并用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤。取续滤液,加入考马斯亮蓝 G-250,放置 2 min 后在 595 nm 波长处测定吸收度值,计算样品中游离 UOX 的浓度。另取 UOMVLs,直接用氯仿破乳后同法操作取续滤液,并用所得吸收度值计算 UOMVLs 中的药物总浓度。重复 3 次,计算包封率。

1.2.3 UOMVLs 粒径和 Zeta 电位的测定 使用测微尺测定 UOMVLs 的平均粒径,每次计数量为 500 个微粒,计数 3 次。将每小段间隔距离划分为 5 μm 一组,共分为 9 组,统计 UOMVLs 平均粒径与粒径分布范围。将 UOMVLs 用蒸馏水稀释 10 倍后,激光粒度仪测定其 Zeta 电位。

1.2.4 大鼠体内药代动力学过程考察 将 12 只雄性 SD 大鼠分为 2 组,每组 6 只。分别静脉注射 UOMVLs 和 UOX,剂量为 2 U/kg。分别于给药后 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 眼眶下静脉丛取血 0.2 mL 置于 Ephedoff 管中,离心,取上层血清,按照 Tan 等^[11]方法测定血清中 UOX 的活性。根据所测结果,绘制平均血药活性-时间曲线,用 DAS 2.1.1 软件计算药代动力学参数。

1.2.5 UOMVLs 对高尿酸血症大鼠模型降尿酸作用的考察 将 24 只 SD 雄性大鼠(禁食 12 h)随机分为 4 组,每组 6 只,分别为 UOMVLs 组、UOX 组、高尿酸血症模型组(模型组)和正常组。UOMVLs 组、UOX 组、模型组大鼠按照 500 mg/kg 一次性灌胃次黄嘌呤 2 mL 后,按照 100 mg/kg 皮下注射氧嗪酸钾 1 mL。造模 1 h 后,UOMVLs 组和 UOX 组分别静脉注射 1 mL (0.47 U/mL) UOMVLs 和游离 UOX。造模 1、2、3、5、7、9、12、24、36、48 h 后眼眶下静脉丛取血 0.2 mL,置于 37 °C 水浴中 20 min,离心,取血清。使用尿酸测定

试剂盒测定血清中的尿酸含量。

1.2.6 统计学方法 采用 DAS 2.1.1 软件处理经时血药浓度数据,以统计矩求出药时曲线下面积(AUC)、峰浓度($C_{\max}$)、达峰时间($T_{\max}$)、半衰期($t_{1/2}$)等主要药代动力学参数。AUC 和 $C_{\max}$ 先进行自然对数转换,再进行方差分析和双单侧 t 检验分析, $T_{\max}$ 进行非参检验的秩和检验分析, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 UOMVLs 包封率、粒径和 Zeta 电位

UOMVLs 包封率为(63.75 ± 3.65)%,粒径为(22.56 ± 1.70) μm , Zeta 电位为(-41.81 ± 6.59) mV。

2.2 药代动力学参数

SD 大鼠静脉注射 UOMVLs 和 UOX 后,血药活性-时间曲线见图 1。将数据经 DAS 2.1.1 软件计算,得到药动学参数,见附表。

由图 1 可见,UOX 组酶活性在大鼠体内迅速下降,在 2 h 时已经完全失活;而在此时,UOMVLs 组活性约为 UOX 组最高活性的 2 倍,酶活性下降趋势缓慢。至 12 h 时,UOMVLs 组酶仍保持一定活

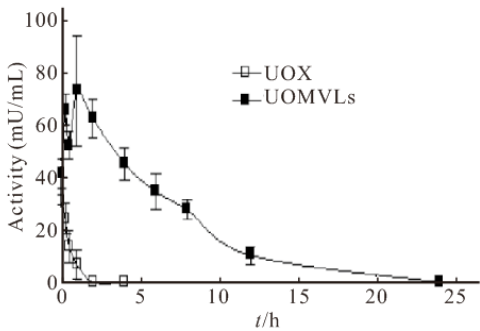


图 1 UOMVLs 及 UOX 的活性-时间曲线($n=6$)

Fig 1 Time and activity curve of UOMVLs and UOX ($n=6$)

附表 UOMVLs 及 UOX 在大鼠体内的药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table Pharmacokinetic parameters of UOMVLs and UOX in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Parameter	UOMVLs	UOX	<i>P</i>
$T_{\max}$ (h)	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.059
$C_{\max}$ (U/L)	73.04 ± 6.35	31.30 ± 6.03	0.000
$t_{1/2}$ (h)	3.49 ± 0.80	1.17 ± 0.33	0.000
AUC_{0-t} (U/L · h)	446.27 ± 70.60	27.80 ± 10.36	0.000
$AUC_{0-\infty}$ (U/L · h)	498.83 ± 58.85	28.49 ± 9.95	0.000

$T_{\max}$: Time to peak concentration; $C_{\max}$: Peak concentration; $t_{1/2}$: Elimination half-life; AUC_{0-t} : Area under time-concentration curve from 0 to last draw time; $AUC_{0-\infty}$: Area under time-concentration curve from 0 to infinity time

性。附表数据表明,UOMVLs 静脉注射血药浓度峰值约为 UOX 的 2.36 倍;达峰时间延迟;UOMVLs 的相对生物利用度是 UOX 原料药的(1750.90 ± 206.56)%。

2.3 UOMVLs 和 UOX 药效学特性分析

由图 2 可见,本实验采用次黄嘌呤和氧嗪酸钾成功构建了大鼠高尿酸模型。UOMVLs 组、UOX 组、模型组大鼠血尿酸水平在造模 1 h 后明显高于正常组大鼠($P<0.05$);干预治疗后,UOMVLs 组大鼠血尿酸水平降至正常组水平($163.40 \mu\text{mol/L}$)不超过 9 h;而 UOX 组血尿酸水平降至正常组水平需要大约 48 h,此时模型组尿酸水平也降至 $159.98 \mu\text{mol/L}$ 。说明注射 UOMVLs 后,大鼠血清尿酸水平下降速度明显快于模型组,而注射 UOX 后,大鼠血清尿酸水平下降不明显。

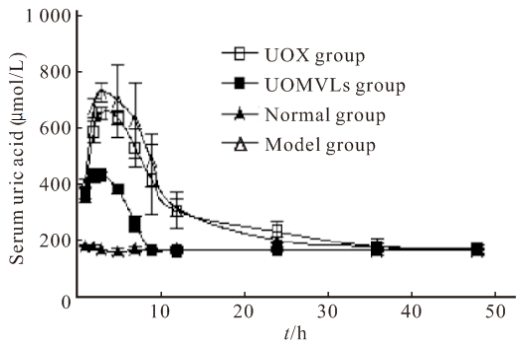


图 2 UOMVLs 和 UOX 对大鼠血清尿酸水平的影响($n=6$)

Fig 2 Effect of UOMVLs and UOX on serum uric acid ($n=6$)

3 讨论

为了克服 UOX 稳定性差、半衰期短、需要频繁给药及具有很强免疫原性等缺点,国内外已有下列研究:对 UOX 进行聚乙二醇修饰^[12];将尿酸酶与白蛋白交联^[13];将 UOX 制备成脂质纳米粒^[14];将 PEG 化尿酸酶包封于海藻酸盐微囊中^[15]。这些研究在一定程度上提高了 UOX 的热稳定性及抗蛋白水解能力、延长了 UOX 的半衰期,并在提高其体内药效方面发挥了作用。但是,以上方法都不能使尿酸酶发挥其最佳的催化活性,且大多出现了尿酸酶修饰不均一、包封率低、生物相容性较低、容易引起凝血等缺点。

多囊脂质体是一种酶类药物的新型制剂,内部含有大量的水相,适用于亲水性和大分子药物的包载。据文献^[16,17]报道,多囊脂质体具有更好的稳定性及更长的缓释时间,可提高药物的生物利用度。本研究制备的 UOMVLs 拥有更大的包封容积,克

服了一般脂质体对亲水性药物包封率低的缺点。UOMVLs 为多囊泡的非同心圆结构,内部为磷脂双分子层形成的囊泡,然后通过如三油酸甘油酯将每个囊泡连接起来。当多囊脂质体内部的部分小囊泡破裂时,囊泡的完整性却不会受到破坏,其整体结构的稳定性并不会受太大影响,从而可以延缓药物的释放。本研究结果显示 UOX 在大鼠体内很快失活,UOMVLs 较 UOX 半衰期延长、达峰时间延后、生物利用度提高。并采用次黄嘌呤和氧嗪酸钾成功构建了大鼠高尿酸模型,考察尿酸酶在高尿酸血症大鼠体内的降尿酸作用。体内初步药效学实验表明,UOMVLs 降尿酸作用显著,而 UOX 降尿酸作用不明显,这可能是由于 UOX 在大鼠体内很快失活所致。目前尚未见 UOMVLs 的药物代谢动力学和药效学研究的相关报道,本实验为尿酸酶的临床应用提供了实验依据。

参 考 文 献

- 1 杨 兰. 氯沙坦钾片治疗高血压合并高尿酸血症的疗效分析. 临床合理用药杂志,2014;7(118):29-30.
- 2 Me Uen PB, Bleyer AJ, Erlinger TP, *et al.* Serum uric acid predicts incident hypertension in a iethnicohort: the atherosclerosis risk in communities study. Hypertension,2006;48(6):1037-1042.
- 3 Hakoda M. Epidemiology of hyperuricemia and gout in Japan. Nihon Rinsho,2008;66(4):647-652.
- 4 Chien KL, Hsu HC, Sung FC, *et al.* Hyperuricemia as a risk factor on cardiovascular events in Taiwan: The Chin-Shan Community Cardiovascular Cohort Study. Atherosclerosis,2005;183(1):147-155.
- 5 Freitas DS, Spencer PJ, Vassão RC, *et al.* Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase. Int J Pharm,2010;387(1-2):215-222.
- 6 Tan QY, Wang N, Yang H, *et al.* Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles. Int J Pharm,2010;384(1-2):165-172.
- 7 王 娜, 谭群友, 徐美玲等. 产朊假丝酵母尿酸酶脂质体的酶学性质及其免疫原性. 中国生物制品学杂志,2011;24(5):547-549.
- 8 Chen C, Han D, Zhang Y, *et al.* The freeze-thawed and freeze-dried stability of cytarabine-encapsulated multivesicular liposomes. Int J Pharm,2010;387(1-2):147-153.
- 9 Jiao YH, Sun KX, Mu HJ, *et al.* Preparation of sustained release multivesicular liposome for thymopentin and preliminary study on its pharmacokinetics in rats. Yao Xue Xue Bao,2008;43(7):756-760.
- 10 Ramprasad MP, Amini A, Kararli T, *et al.* The sustained granulopoietic effect of progenipoietin encapsulated in multivesicular liposomes. Int J Pharm,2003;261(1-2):93-103.
- 11 Tan QY, Zhang JQ, Wang N, *et al.* Uricase from Bacillus fastidious loaded in alkaline enzymosomes; enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats. Eur J Pharm Biopharm,2012;82(1):43-48.
- 12 张 纯. 尿酸酶的聚乙二醇修饰及其药性的初步评价. 重庆:重庆医科大学药学院,2011.
- 13 Poznansky MJ. *In vitro* and *in vivo* activity of soluble cross-linked uricasealbumin polymers;a model for enzyme therapy. Life Sci,1979;24(2):153-158.
- 14 王 娜, 赵春景, 黄开顺等. 产朊假丝酵母尿酸酶脂质纳米粒的制备及其药效学特性分析. 中国生物制品学杂志,2013;26(8):1147-1150.
- 15 O'Loughlin JA, Bruder JM, Lysaght MJ. Degradation of low molecular weight uremic solutes by oral delivery of encapsulated enzymes. ASAIO J,2004;50(2):253-260.
- 16 Sankaram M. A lipid based depot for sustained release drug delivery. Prog Lipid Res,2002;41(5):392-406.
- 17 王晓梅, 唐 星, 何海冰. 多囊脂质体的研究进展. 中国新药杂志,2006;15(15):1243-1246.

(2015-03-17 收稿,2015-07-15 修回)

编辑 沈 进