

## 基础医学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000437

## 过氧化氢酶脂质体的药代动力学和生物等效性初步研究

邓雪, 何丹, 周云莉, 张 救, 熊华蓉, 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:**研究过氧化氢酶脂质体(catalase liposomes, CALP)在 SD 大鼠体内的药代动力学和生物等效性。**方法:**采用逆向蒸发法制备了 CALP,并测定其粒径、Zeta 电位及包封率。将 12 只雄性 SD 大鼠随机分为 2 组,分别静脉注射 CALP 和游离过氧化氢酶(catalase, CAT),测定给药后不同时间点大鼠血浆中过氧化氢酶的活性。采用 DAS 2.1.1 软件计算药物代谢动力学参数,并对 CALP 和 CAT 进行生物等效性评价。**结果:**CALP 的包封率为 $(53.72 \pm 1.67)\%$ ,粒径和 Zeta 电位分别为 $(405.40 \pm 21.89)$  nm 和 $(-15.70 \pm 3.22)$  mV。CALP 和 CAT 的主要药物代谢动力学参数  $AUC_{0-4}$  分别为 $(203.22 \pm 11.75)$  U(ml·h)和 $(50.92 \pm 3.51)$  U(ml·h),  $C_{max}$  分别为 $(70.79 \pm 1.33)$  U/ml 和 $(51.48 \pm 2.78)$  U/ml,  $T_{max}$  分别为 $(0.58 \pm 0.14)$  h 和 $(0.17 \pm 0.00)$  h。lnAUC、ln $C_{max}$  经方差分析和双单侧检验证明差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。  $AUC_{0-1}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  和  $C_{max}$  的 90% 可信区间分别为 133.8%~140.1%, 132.3%~146.7%, 104.7%~107.5%。CALP 和 CAT 的  $T_{max}$  经非参数法检验差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。CALP 的相对生物利用度为 $(399.1 \pm 23.1)\%$ 。**结论:**CALP 提高了过氧化氢酶的生物利用度, CALP 与 CAT 不具有生物等效性。

**【关键词】**过氧化氢酶;脂质体;药代动力学;生物等效性**【中图分类号】**R944.9**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-07-09

## Studies on pharmacokinetics and bioequivalence of catalase in catalase liposome

Deng Xue, He Dan, Zhou Yunli, Zhang Mi, Xiong Huarong, Zhang Jingqing

(Department of Medicine, Engineering Research Center, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To study the pharmacokinetic and bioequivalence of catalase liposome (CALP) in SD rats. **Methods:** The CALP was prepared by reverse-phase evaporation method and the entrapment efficiency, size and zeta potential of CALP were detected. Twelve male SD rats were randomly divided into two groups. The activity of catalase was assayed after respectively intravenous injecting CALP and free catalase (CAT) in two groups. The pharmacokinetic parameters were calculated by software DAS 2.1.1, then the bioequivalence was judged. **Results:** The entrapment efficiency of CALP was  $(53.72 \pm 1.67)\%$ . The average particle size was  $(405.40 \pm 21.89)$  nm, and zeta potential was  $(-15.7 \pm 3.22)$  mV.  $AUC_{0-4}$  of CALP and CAT were  $(203.22 \pm 11.75)$  U(ml·h) and  $(50.92 \pm 3.51)$  U(ml·h),  $C_{max}$  of CALP and CAT were  $(70.79 \pm 1.33)$  U/ml and  $(51.48 \pm 2.78)$  U/ml.  $T_{max}$  of CALP and CAT were  $(0.58 \pm 0.14)$  h and  $(0.17 \pm 0.00)$  h. The 90% confidential intervals of  $AUC_{0-4}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  and  $C_{max}$  of tested formulation were 133.8%~140.1%, 132.3%~146.7%, 104.7%~107.5%, respectively. Based on analysis of variance and two-sided t-test, lnAUC and ln $C_{max}$  differed statistically ( $P < 0.05$ ), while  $T_{max}$  did not differ statistically ( $P > 0.05$ ) between CALP and CAT. The relative bioavailability of CALP was  $(399.1 \pm 23.1)\%$ . **Conclusion:** CALP improves the bioavailability of catalase. CALP and CAT are not bioequivalent.

**【Key words】**catalase; liposomes; pharmacokinetics; bioavailability

过氧化氢酶(catalase, CAT)是一种高效、安全、无毒的生物催化剂,能够快速催化过氧化氢分解为水和氧气<sup>[1]</sup>。据文献报道,过氧化氢可促进细胞损伤

和组织破坏,与神经系统疾病<sup>[2]</sup>、自身免疫性疾病<sup>[3]</sup>、炎症反应<sup>[4-5]</sup>等密切相关。CAT 促使过氧化氢分解,许多研究表明 CAT 具有减轻和治疗急性氧化损伤的作用<sup>[6]</sup>,在医药业上具有良好的应用前景。

CAT 作为一种蛋白类药物,存在稳定性低,在酸、碱或酶的作用下易失活<sup>[7]</sup>;体内半衰期短,消除快,无法充分发挥其疗效;机体易产生免疫反应等缺点。脂质体是一种具有靶向功能的新型药物载体,与生物体细胞结构类似,具有提高药物稳定性、提高药物生物利用度、降低药物毒副作用等优点。

作者介绍:邓雪, Email: 852694772@qq.com,

研究方向:药物新剂型与新技术。

通信作者:张景劼, Email: zjqrae01@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30973645);重庆市教委资助项目(高校优秀人才资助项目)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150112.1647.002.html>  
(2015-01-12)

为了克服 CAT 的缺点,本实验将 CAT 包载于脂质体中,并着重考察过氧化氢酶脂质体(catalase liposomes, CALP)在 SD 大鼠体内的药代动力学,希望提高 CAT 的生物利用度,达到一定的缓释效果,延长 CAT 的作用时间。目前尚未见 CALP 的药物代谢动力学和生物等效性研究的相关报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂、仪器和动物

过氧化氢酶(Sigma-Aldrich 公司);大豆卵磷脂(德国 Lucas Meyer 公司);胆固醇(广州天马精细化工厂);氢氧化钠(重庆川东化工集团有限公司);乙醚、氯仿(重庆川东化工集团有限公司)。

AG-135 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);UV-7504 PC 型紫外分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);ZS90 型激光粒度电位仪(英国马尔文公司);PHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);KQ-2200B 型水浴型超声仪(江苏昆山市超声仪器有限公司);Sephadex G-200 层析柱(上海楷洋生物技术有限公司)。

清洁级 SD 大鼠,雄性,(230 ± 20) g,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物合格证书:SCXK 渝 2012-0001。

### 1.2 方法

**1.2.1 CALP 的制备** 本文采用逆向蒸发法<sup>[8-9]</sup>制备了 CALP。按摩尔比 1:1 称取大豆卵磷脂和胆固醇,溶于氯仿,置于圆底烧瓶中。将 CAT 溶于 Bicine-NaOH 缓冲液(pH8.5)。在旋转蒸发器上减压挥干氯仿,圆底烧瓶内壁形成一层均匀脂质膜。加入乙醚溶解脂质膜后,再加入 CAT 溶液,然后在水浴型超声仪上超声,直至形成稳定的 W/O 型乳剂。再次在旋转蒸发器上减压蒸发直至凝胶脱落,得到均匀的脂质体混悬液。经 0.22 μm 滤膜过滤 3 次,即得 CALP。

**1.2.2 CALP 包封率的测定** 按照参考文献报道方法采用凝胶柱分离-考马斯亮蓝法<sup>[10]</sup>测定包封率。吸取 CALP 混悬液 0.5 ml 进样 Sephadex G-200 层析柱,用 pH8.5 的 Bicine-NaOH 缓冲液洗脱。取其中 100 μl 洗脱液加入异丙醇-乙醇(4:1)破乳,然后加入考马斯亮蓝,以同法处理的空白脂质体作为对照,在 595 nm 波长处测定吸收度值,重复 3 次。

**1.2.3 CALP 的粒径和 Zeta 电位的测定** 取少量 CALP 混悬液,以 1:10 比例稀释 10 倍后,在 25 °C 下用激光粒度电位仪测定 CALP 的粒径和 ζ 电位。

**1.2.4 动物分组及给药** 将 12 只雄性 SD 大鼠按照简单随机方法分为 2 组,每组 6 只。分别按照 1 000 U/kg 静脉注射 1.15 ml 的 CALP 和 CAT。在给药后,眼眶下静脉取血,将血样离心,分离血清按照可见分光光度法测定酶的活性<sup>[11]</sup>。

**1.2.5 药时曲线的绘制和药动力学参数的计算** 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。经时血药浓度数据  $C_{max}$  及  $T_{max}$  采用实测值,  $AUC_{0-1}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  和  $t_{1/2}$  为拟合数据。根据  $AUC_{0-1}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  计算 CALP 的平均相对生物利用度,即:平均相对生物利用度(F)=

$AUC(CALP)/AUC(CAT)$ 。

**1.2.6 生物等效性的评价** 将 CALP 和 CAT 的  $AUC_{0-1}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  及  $C_{max}$  经对数转换后进行方差分析,再采用双向单侧  $t$  检验,90%可信限考察,  $T_{max}$  采用非参数统计 Wilcoxon 检验。评价 CALP 和 CAT 是否具有生物等效性。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 CALP 的包封率

制备 3 批 CALP,测得的平均包封率为(53.72 ± 1.67)%。

### 2.2 CALP 的粒径和 Zeta 电位

经马尔文激光粒度电位仪测定的 CALP 的平均粒径为(405.4 ± 21.89) nm, ζ 电位为(-15.7 ± 3.22) mV。

### 2.3 药时曲线和药动力学参数

2 组雄性 SD 大鼠分别静脉注射 1.15 ml 的 CALP 和 CAT 后,过氧化氢酶的药-时曲线见图 1。CALP 和 CAT 在 SD 大鼠体内的药代动力学参数见表 1。

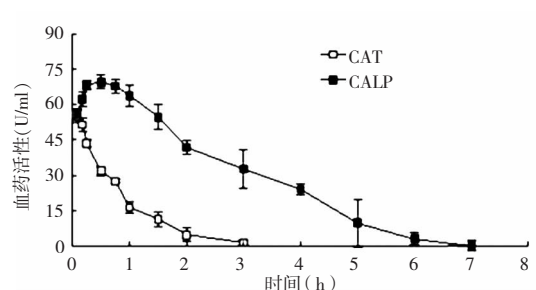


图 1 SD 大鼠静脉注射 CALP 和 CAT 后平均血药活性-时间曲线 (n=6)

Fig.1 Mean plasma activity-time curve after injecting CALP and CAT in 6 SD rats (n=6)

表 1 SD 大鼠静脉注射 CALP 和 CAT 后的主要药动力学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab.1 Main pharmacokinetic parameters after injecting CALP and CAT in rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 参数                                        | CALP           | CAT          |
|-------------------------------------------|----------------|--------------|
| $AUC_{(0-7h)} [U \cdot (ml \cdot h)]$     | 203.22 ± 11.75 | 50.92 ± 3.51 |
| $AUC_{(0-\infty)} [U \cdot (ml \cdot h)]$ | 260.04 ± 5.92  | 51.28 ± 3.71 |
| $C_{max} (U/ml)$                          | 70.79 ± 1.33   | 51.48 ± 2.78 |
| $T_{max} (h)$                             | 0.58 ± 0.14    | 0.17 ± 0.00  |
| $t_{1/2} (h)$                             | 2.19 ± 1.15    | 0.37 ± 0.08  |

如图 1 所示,SD 大鼠分别静脉注射 CALP 和 CAT 后, CALP 组酶活性约在半小时达峰值,此时 CALP 组酶活性为 70.79 U/ml;而 CAT 组酶活性在 0.17 h 时达峰值,此时 CALP 中 CAT 的活性为 51.48 U/ml, CALP 组酶最高活性为 CAT 组酶最高活性的 130%。CAT 组酶活性在大鼠体内迅速下降,在 3 h 时酶活性几乎完全丧失;在此时, CALP 组酶活性为 CAT 组酶最高活性的 59.23%,保留了自身活性的 50%,酶活性下降缓慢。6 h 时, CALP 组酶仍有一定活性,且在雄性 SD 大鼠体内酶活性能维持 7 h。实验结果表明, CALP 延长了 CAT 在

大鼠体内的滞留时间。

如表 1 所示,CALP 组和 CAT 组的  $t_{1/2}$  分别为  $(2.19 \pm 1.15)$  h 和  $(0.37 \pm 0.08)$  h,  $t_{1/2}$  延长了约 5 倍。 $T_{max}$  分别为  $(0.58 \pm 0.14)$  h 和  $(0.17 \pm 0.00)$  h,  $T_{max}$  延长了约 2.5 倍。 $C_{max}$  分别为  $(70.79 \pm 1.33)$  U/ml 和  $(51.48 \pm 2.78)$  U/ml,  $AUC_{(0-t)}$  分别为  $(203.22 \pm 11.75)$  U·h/ml 和  $(50.92 \pm 3.50)$  U·h/ml,  $AUC_{0-\infty}$  分别为  $(260.04 \pm 5.92)$  U(ml·h) 和  $(51.28 \pm 3.71)$  U(ml·h)。经计算, CALP 平均相对生物利用度  $F_{0-t}$  为  $(399.1 \pm 23.1)\%$ , 提高了约 3 倍。 $F_{0-\infty}$  为  $507.1\% \pm 11.5\%$ , 提高了约 4 倍。

#### 2.4 生物等效性评价结果

经过 DAS2.1.1 软件处理,  $AUC_{0-t}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  和  $C_{max}$  经对数转换后进行双单侧  $t$  检验及 90% 可信区间考察。结果如表 3 所示, CALP 与 CAT 的  $\ln AUC_{0-t}$  双单侧  $t$  检验结果如下:  $t_1 = -8.070$ ,  $t_2 = 38.467$ , 90% 置信区间为 133.8%~140.1%, 结果显示生物不等效。CALP 与 CAT 的  $\ln AUC_{0-\infty}$  双单侧  $t$  检验结果如下:  $t_1 = -4.286$ ,  $t_2 = 17.623$ , 90% 置信区间为 132.3%~146.7%, 结果显示生物不等效。CALP 与 CAT 的  $\ln C_{max}$  双单侧  $t$  检验结果如下:  $t_1 = 56.270$ ,  $t_2 = 55.688$ , 90% 置信区间为 104.7%~107.5%, 结果显示生物等效。 $T_{max}$  进行非参数法检验, CALP 和 CAT 的  $T_{max}$  具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。 $AUC_{0-t}$ 、 $AUC_{0-\infty}$  和  $C_{max}$  经对数转换后进行双单侧  $t$  检验结果如表 2 所示, CALP 与 CAT 间具有统计学差异, 不具有生物等效性 ( $P < 0.05$ )。按照生物等效性判定标准, CALP 与 CAT 不具有生物等效性。

表 2 过氧化氢酶生物等效性实验方差分析结果

Tab. 2 Results of bioequivalence test of catalase based on analysis of variance

|               | $AUC_{0-t}$ | $AUC_{0-\infty}$ | $C_{max}$ |
|---------------|-------------|------------------|-----------|
| $P$ 值 (经对数转换) | 0.001       | 0.006            | 0.000     |

表 3 过氧化氢酶生物等效性实验双单侧  $t$  检验结果

Tab. 3 Results of bioequivalence test of catalase based on two-sided  $t$ -test

| 参数                   | $t_1$  | $t_2$  | 90%CI         |
|----------------------|--------|--------|---------------|
| $\ln AUC_{0-t}$      | -8.070 | 38.467 | 133.8%~140.1% |
| $\ln AUC_{0-\infty}$ | -4.286 | 17.623 | 132.3%~146.7% |
| $\ln C_{max}$        | 56.270 | 55.688 | 104.7%~107.5% |

### 3 讨论

CAT 存在蛋白类药物普遍存在的活性低等缺点, 在医药领域的应用受到一定限制。据文献报道, 为了克服以上缺点, 对 CAT 进行了化学修饰, 如对 CAT 进行 PEG 交联化; 选择微球作为长期给药剂型, 如多聚乳酸-聚乙二醇微球对 CAT 进行包埋; 制备过氧化氢酶微球等。

脂质体是一种新型给药系统。脂质体将药物包封于类脂质双分子层内形成微型囊泡, 具有缓释、靶向、降低药物毒性、提高药物稳定性等优点。Howard 等<sup>[12]</sup>曾将 CAT 装载于 PEG 修饰的脂质体中, 不仅

提高药效, 还具有血管内皮靶向作用。

目前尚未见 CALP 的药物代谢动力学和生物等效性研究的相关报道。本研究将 CAT 制备成脂质体, 酶分子能够以各种形式包裹在在脂质体中, 不会泄露到体液中, 从而到达长效、高效的目的。本文首次对过氧化氢酶脂质体在大鼠体内的药代动力学和生物等效性进行了初步研究。结果表明 CALP 与 CAT 不具有生物等效性。CALP 提高了酶的活性和生物利用度, 延长了酶的  $t_{1/2}$  和  $T_{max}$ , 缓释效果明显。综上所述, CALP 具有广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] Amna M, Guillaume Q, Sejr C, et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants stress-mimic models[J]. J Exp Bot, 2010, 61(15): 4197-4220.
- [2] Yainoy S, Houbloyfa P, Eiamphungporn W, et al. Engineering of chimeric catalase-Angiopep-2 for intracellular protection of brain endothelial cells against oxidative stress[J]. Int J Biol Macromol, 2014(68C): 60-66.
- [3] Kim HR, Lee A, Choi EJ, et al. Attenuation of experimental colitis in glutathione peroxidase 1 and catalase double knockout mice through enhancing regulatory T cell function[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95332.
- [4] Trevisan G, Hoffmeister C, Fortes Rossato M, et al. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout[J]. Free Radic Biol Med, 2014(72C): 200-209.
- [5] Hu P, Tirelli N. Scavenging ROS: superoxide dismutase/catalase mimetics by the use of an oxidation-sensitive nanocarrier/enzyme conjugate[J]. Bioconjug Chem, 2012, 23(3): 438-449.
- [6] 箭嘉, 李平华. 过氧化氢酶与甲基强的松龙对实验性脱髓鞘性视神经炎的抑制作用[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(12): 1685-1688.
- [7] Wang X, Zhang Y, Li T, et al. Generation 9 polyamidoamine dendrimer encapsulated platinum nanoparticle mimics catalase size, shape, and catalytic activity[J]. Langmuir, 2013, 29(17): 5262-5270.
- [8] 胡鹏翼, 郑琴, 刘彦君, 等. pH 梯度结合逆向蒸发法制备槐定碱纳米脂质体及体外释放度研究[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(14): 1275-1279.
- [9] 刘娟, 谭群友, 王娜, 等. 产朊假丝酵母尿酸酶纳米脂质体的研制及其理化性质[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(15): 1184-1189.
- [10] Tan Q, Zhang J, Wang N, et al. Uricase from Bacillus fastidious loaded in alkaline enzyosomes: enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2012, 82(1): 43-48.
- [11] 周丹丹, 吴文卫, 杨逢乐, 等. 两种过氧化氢酶活性测定方法的比较[J]. 江西农业学报, 2009, 21(1): 118-120.
- [12] Howard MD, Greineder CF, Hood ED, Muzykantov VR. Endothelial targeting of liposomes encapsulating SOD/catalase mimetic EUK-134 alleviates acute pulmonary inflammation[J]. J Control Release, 2014(177): 34-41.

(责任编辑: 关蕴良)