

戈那瑞林在奶牛体内药物代谢动力学*

刘磊¹,李引乾^{1*},周广辉¹,邱瑾丽¹,张东兴¹,
岑桂英²,熊永洁¹,朱晓娟¹,关永娟¹,梁冠翔¹

(1. 西北农林科技大学 动物医学院,陕西杨凌 712100;2. 宁波第二激素厂,浙江慈溪 315300)

摘要:戈那瑞林(Cystorelin)为人工合成的促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)类似物。分析戈那瑞林在奶牛体内的药物代谢动力学过程,以期为兽医临床合理用药提供依据。试验前,对3头奶牛进行卵巢摘除手术,术后30 d单剂量肌肉注射戈那瑞林,在3 h内不同时间12次静脉采血,应用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清中促性腺激素释放激素(GnRH)质量浓度,以残数法拟合药-时曲线,计算药物动力学参数。结果显示,戈那瑞林在奶牛体内的药物动力学配置符合有吸收因素二室开放模型,其最佳药-时曲线方程为 $C=102.3426e^{-8.4166t}+7.5778e^{-0.4014t}-109.9204e^{-11.5226t}$ 。主要药物动力学参数分别为,消除相半衰期($t_{1/2\beta}$)(1.7311 ± 0.1079) h、药-时曲线下面积(AUC)(21.5054 ± 2.2476) ng/mL·h、峰质量浓度(C_{max})(16.2017 ± 1.9901) ng/mL、达峰时间(t_{max})(0.14 ± 0.052) h。结果表明,奶牛肌肉注射戈那瑞林后,吸收快,消除也快。

关键词:戈那瑞林;奶牛;药物代谢动力学

中图分类号:S859.79⁺3

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2010)04-0024-04

Pharmacokinetics of Cystorelin in Cow

LIU Lei¹, LI Yinqian^{1*}, ZHOU Guanghui¹, QIU Jinli¹,
ZHANG Dongxing¹, CEN Guiying², XIONG Yongjie¹,
ZHU Xiaojuan¹, GUAN Yongjuan¹ and LIANG Guanxiang¹

(1. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;
2. Ningbo Second Hormone Factory, Cixi Zhejiang 315300, China)

Abstract: Cystorelin is a synthetic analogue of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). In order to provide theoretical basis of rational drug used for veterinary clinical, the pharmacokinetic course of Cystorelin in cow was analyzed. Three cows after ovariectomy were treated with a single dosage of injection of Cystorelin, and 12 blood samples of vein were collected within three hours after giving drug. The concentrations of Cystorelin in serum were determined by ELISA. The two-compartment model with absorption factor adequately described concentrations of Cystorelin in serum disposition and the best concentration-time equation was $C=102.3426e^{-8.4166t}+7.5778e^{-0.4014t}-109.9204e^{-11.5226t}$. The primary pharmacokinetics parameters of Cystorelin in cow were as follows: half-time of elimination phase ($t_{1/2\beta}$) was (1.7311 ± 0.1079) h, area under curve (AUC) was (21.5054 ± 2.2476) ng/mL·h, peak concentration (C_{max}) was (16.2017 ± 1.9901) ng/mL, and time to peak (t_{max}) was (0.14 ± 0.052) h. The results showed that Cystorelin injected into cow muscle was absorbed quickly and eliminated quickly, too.

Key words: Cystorelin; Cow; Pharmacokinetics

* 收稿日期:2009-07-09 修回日期:2009-10-18
作者简介:刘磊(1986—),男,陕西西安人,在读硕士,主要从事兽医药理学研究。E-mail:sean-shy@163.com
* 通讯作者:李引乾(1962—),男,副教授,博士,主要从事兽医药理学与毒理学研究。E-mail:liyinqian628@163.com

戈那瑞林(Cystorelin)为人工合成的促性腺激素释放激素(GnRH)的类似物,在生理上、化学上与内源性牛下丘脑释放因子相符^[1]。肌注之后可发挥与纯天然激素类似的效果,GnRH 由丘脑下部以脉冲方式分泌进入垂体门脉系统到垂体前叶^[2],与垂体促性腺激素细胞上的高亲和力受体特异结合,促进垂体前叶黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)的合成和分泌^[3]。通过提高普通的下丘脑-垂体功能,改善总体受精率,从而恢复卵泡的正常生长和成熟,主要用于奶牛卵泡囊肿的治疗^[4]。

为全面了解戈那瑞林在奶牛体内的药物代谢动力学特征,以肌内注射给药的方式,应用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清中 GnRH 的质量浓度,再用残数法拟合药-时曲线,计算药物动力学参数,以期为兽医临床合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 试材

1.1.1 试验仪器 RT-6000 型全自动酶标仪,深圳雷杜生命科学仪器有限公司;96 孔细胞培养板,Nunc,丹麦产品;1-15K 低温高速离心机,Sigma;80-2 离心机,上海手术器械厂;旋涡混合器,可调微量移液器等。

1.1.2 试验动物 中国荷斯坦奶牛 3 头,7~8 岁,由杨陵区黎张沟奶牛养殖小区提供。试验前

以盐酸普鲁卡因进行硬膜外麻醉,手术部位以盐酸普鲁卡因进行浸润麻醉。结扎卵巢动脉,切除两侧卵巢。术后按一般手术进行护理,30 d 后进行试验。

1.1.3 试验药品与试剂 注射用戈那瑞林(仔仔多):每瓶 100 μg ,批号 080218,宁波第二激素厂提供;注射用戈那瑞林稀释液:每瓶 5 mL,批号 080218,宁波第二激素厂提供;美国牛(Cattle) GnRH ELISA 检测试剂盒,北京北方伟业发展有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 给药 奶牛单剂量肌肉注射戈那瑞林 5 mL(100 μg)。奶牛给药前禁食 12 h,自由饮水。

1.2.2 血样采集及处理 采血时间的确定:每头奶牛于给药前采集空白对照血 5 mL。给药后 0.08、0.17、0.25、0.33、0.50、0.75、1.00、1.33、1.67、2.00、2.50 和 3.00 h 各采血 5 mL。

血清的制备:将采集的血液置于试管中,放置成斜面,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中作用 30 min,再置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱作用 30 min,然后以 4 000 r/min 离心 10 min,即得血清。血清样品置-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存至测定。

1.2.3 血清样品的测定 取试剂标准品,按表 1 方法稀释配制成质量浓度分别为 80、40、20、10、5.0、2.5、0 ng/mL 的 GnRH 标准品溶液。

表 1 GnRH 标准液的配制

Table 1 The preparation standard solution of GnRH

序号 Number	质量浓度/(ng/mL)Concentration	操作方法 Method
1	80	原始质量浓度不用稀释直接加入 50 μL
2	40	100 μL 的原倍标准品加入 100 μL 的标准品稀释液
3	20	100 μL 的 2 号标准品加入 100 μL 的标准品稀释液
4	10	100 μL 的 3 号标准品加入 100 μL 的标准品稀释液
5	5.0	100 μL 的 4 号标准品加入 100 μL 的标准品稀释液
6	2.5	100 μL 的 5 号标准品加入 100 μL 的标准品稀释液
空白对照 Blank control	0	原始质量浓度不用稀释直接加入 50 μL

配制好 GnRH 标准品后,按下列方法操作:①加入稀释好的标准品 50 μL 于反应孔,加入待测样品 50 μL 于反应孔内。立即加入 50 μL 的生物素标记的抗体,盖上膜板,轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。②甩去孔内液体,每孔加满洗涤液,振荡 30 s,甩去洗涤液,用吸水纸拍干。重复此操作 3 次。③每孔加入 80 μL 的亲合链霉素-HRP,轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。④甩去孔内液体,每孔加满洗涤液,振荡 30 s,甩去洗涤液,用吸

水纸拍干。重复此操作 3 次。⑤每孔加入底物 A、B 各 50 μL ,轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min。避免光照。⑥取出酶标板,迅速加入 50 μL 终止液,加入终止液后应立即检测结果。在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

RT-6000 型全自动酶标仪具有多种计算模式,能够自动根据标准品质量浓度和 OD 值拟合标准曲线,并能将样品 OD 值换算为质量浓度值,直接输出需要的质量浓度数据。

1.2.4 药物动力学参数计算 采用残数法逐只奶牛拟合药时曲线^[5],方差分析优选模型,计算药物代谢动力学参数^[6-9]。

2 结果与分析

2.1 奶牛血清中戈那瑞林质量浓度的测定结果

奶牛血清中戈那瑞林质量浓度测定结果见表2。由表2可以看出,同时测定不同奶牛体内 GnRH 含量,其结果标准偏差较小,说明戈那瑞林在不同奶牛体内的代谢过程较为稳定。

表 2 奶牛肌注戈那瑞林后血清中 GnRH 质量浓度测定结果

Table 2 Determination of Cystorelin in serum of cows after intramuscular injection				ng/mL
给药后时间 /h Time after treatment	1 号牛 Cow No. 1	2 号牛 Cow No. 2	3 号牛 Cow No. 3	平均值 ($\bar{x} \pm s$) Mean
0.08	6.6910	7.986	7.709	7.4620±0.6819
0.17	10.5850	11.137	11.06	10.9273±0.2990
0.25	14.3240	13.92	14.601	14.2817±0.3425
0.33	12.1900	11.734	12.88	12.2680±0.5770
0.50	8.1800	8.119	7.814	8.0377±0.1961
0.75	5.6750	6.212	5.481	5.7893±0.3787
1.00	5.0900	5.526	4.792	5.1360±0.3692
1.33	4.3390	4.964	4.18	4.4943±0.4144
1.67	3.7130	4.307	3.467	3.8290±0.4318
2.00	3.3510	3.558	3.007	3.3053±0.2783
2.50	2.9930	3.066	2.412	2.8237±0.3584
3.00	2.2460	2.586	2.064	2.2987±0.2650

表 3 戈那瑞林在奶牛体内的药物动力学参数

Table 3 Pharmacokinetic parameters of Cystorelin in cow after ovariectomy				
动力学参数 Parameter	1 号牛 Cow No. 1	2 号牛 Cow No. 2	3 号牛 Cow No. 3	平均值 Means($\bar{x} \pm s$)
分布相最初质量浓度(A)/(ng/mL) Blood concentration at 0 of distribution phase	102.6166	96.5441	107.8671	102.3426±5.6665
消除相最初质量浓度(B)/(ng/mL) Blood concentration at 0 of elimination phase	7.3002	8.1629	7.2703	7.5778±0.5069
分布相速率常数(α)/h ⁻¹ Rate of disposition phase	8.2072	8.8267	8.2159	8.4166±0.3552
消除相速率常数(β)/h ⁻¹ Rate of elimination phase	0.3831	0.3901	0.4310	0.4014±0.0259
吸收相速率常数(k_a)/h ⁻¹ Rate of absorption phase	10.9195	12.9211	10.7271 *	11.52257±1.2150
分布相半衰期($t_{1/2\alpha}$)/h Half-time of distribution phase	0.0844	0.0785	0.0843	0.0824±0.0034
消除相半衰期($t_{1/2\beta}$)/h Half-time of elimination phase	1.8089	1.7765	1.6079	1.7311±0.1079
吸收相半衰期($t_{1/2k_a}$)/h Half-time of absorption phase	0.0635	0.0536	0.0646	0.060567±0.0061
药-时曲线下面积(AUC)/(ng/mL·h) Area under curve	21.4927	23.7593	19.2642	21.5054±2.2476
中央室→周边室转运速率常数(k_{12})/h ⁻¹ Transport rate from central to outside compartment	4.9994	5.4716	4.8673	5.112767±0.3177
周边室→中央室转运速率常数(k_{21})/h ⁻¹ Transport rate from outside to central compartment	2.0772	2.1244	2.1165	2.106033±0.0253
消除速率常数(k_{el})/h ⁻¹ Elimination rate from central compartment	1.5314	1.6208	1.6730	1.6084±0.0716
达峰时间(t_{max})/h Time to peak	0.17	0.08	0.17	0.14±0.052
峰质量浓度(C_{max})/(ng/mL) Peak concentration	15.1691	18.4959	14.9402	16.2017±1.9901

2.2 药时曲线及拟合

采用残数法对表2数据逐只奶牛拟合药-时曲线。结果表明,单剂量快速肌肉注射戈那瑞林后,戈那瑞林的药时数据符合有吸收因素二室模型,最佳药-时曲线方程为: $C=102.3426e^{-8.4166t}+7.5778e^{-0.4014t}-109.9204e^{-11.5226t}$ 。

2.3 药物动力学参数

根据2.2中所得的药-时曲线,计算戈那瑞林在奶牛体内的药物动力学参数。结果见表3。

由表 3 可知,戈那瑞林在奶牛体内的主要药物动力学参数——消除相半衰期($t_{1/2\beta}$)、药-时曲线下面积(AUC)、消除速率常数(β)、峰质量浓度($C_{\max}$)和达峰时间($t_{\max}$)分别为(1.7311 ± 0.1079) h、(21.5054 ± 2.2476) ng/mL · h、(0.4014 ± 0.0259) h⁻¹、(16.2017 ± 1.9901) ng/mL 和(0.14 ± 0.052) h。

3 小 结

3.1 试验动物的处理与奶牛血清 GnRH 质量浓度测定

为消除内源性促性腺激素释放激素(GnRH)对测定的干扰,选用摘除卵巢的奶牛为试验动物。以酶联免疫吸附法(ELISA)^[10]、RT-6000 型全自动酶标仪测定血清中 GnRH 的质量浓度。该全自动酶标仪具有多种计算模式,能够自动根据标准品质量浓度和 OD 值拟合标准曲线,并能将样品 OD 值换算为质量浓度值,直接输出所需要的质量浓度数据,测定方便。测定结果显示,空白血浆中还有少量内源性 GnRH 存在,但含量相对恒定,3 份空白血清中的 GnRH 含量的 RSD 为 4.89%,可以认为生理性的促性腺激素释放激素不影响外源性 GnRH 的测定。

3.2 戈那瑞林在奶牛体内的药物动力学特征

本试验结果显示,奶牛肌肉注射后,戈那瑞林在奶牛体内的药动学配置符合有吸收因素二室模型特征^[11],其最佳药-时曲线方程为 $C=102.3426e^{-8.4166t}+7.5778e^{-0.4014t}-109.9204e^{-11.5226t}$ 。主要药物动力学参数:消除相半衰期($t_{1/2\beta}$)为

(1.7311 ± 0.1079) h,消除速率常数(k_{el})为(1.6084 ± 0.0716) h⁻¹,药-时曲线下面积(AUC)为(21.5054 ± 2.2476) ng/mL · h,峰质量浓度为(16.2017 ± 1.9901) ng/mL,达峰时间为(0.14 ± 0.052) h。结果表明,奶牛肌注戈那瑞林后,吸收快、消除也快。

参考文献:

[1] 顾涵英.阿拉瑞林[J].中国新药杂志,1999,8(8):546.
[2] Dubois E A,Zandbergen M A,Peute J,*et al.* Evolutionary development of three GnRH systems in vertebrates[J]. Brain Research Bulletin,2002,57 (3-4) :413-418.
[3] 曹 静,陈耀星,王子旭,等.促性腺激素释放激素的研究进展中国畜牧兽医[J].中国畜牧兽医,2007,34 (5) :48-51.
[4] 叶 丹,潘建伟,廖鸣娟,等.促性腺激素释放激素的结构及其生物学功能[J].生物化学与生物物理进展,2003,30(1):49-53.
[5] 吉伯尔迪 M,佩里尔 D[美].药物动力学[M].朱家壁,译.北京:科学出版社,1981.
[6] 刘昌孝.实用药物动力学[M].北京:中国医药科技出版社,2003.
[7] 操继跃,卢从笑.兽医药物动力学[M].北京:中国农业出版社,2005.
[8] 曾衍霖.药物动力学中的第二个计算问题—原始数据的权重与线数字模型房室的确定[J].药学报,1980,15(9):574.
[9] 庞利娜,李引乾,黄 冻,等.黄体酮在奶牛体内的药物动力学[J].西北农业学报,2009,18(3):47-50.
[10] 杨利国,韩正康. GnRH 酶免测定方法的建立[J].黑龙江动物繁殖,1993(3):15-18.
[11] 冯淇辉.兽医药物代谢动力学[M].北京:科学出版社,1983.