

用夹心酶联免疫法研究 hGM-CSF 在大鼠体内的药物代谢动力学

何小庆 雷小虹 韩 锐

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 用灵敏的夹心酶联免疫法(ELISA)建立了检测重组人 hGM-CSF 药代动力学的方法。此方法 hGM-CSF 在 $12.5 \sim 0.39 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内, 检测呈线性相关。最低检测灵敏度为 $0.4 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。本方法不受血清中潜在干扰因素的影响, 检测具高度特异性。大鼠 sc hGM-CSF 50, 100, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后 15 min, 血中即有较高浓度的 hGM-CSF, 1 h 左右达峰浓度, 以后快速下降。皮下给药, 尿中可检测到原型 hGM-CSF, 但累积排泄率较低。本研究为临床合理用药提供依据。

关键词 人粒系巨噬系集落刺激因子(hGM-CSF); 酶联免疫法; 药代动力学

药理研究表明, 人粒系巨噬系集落刺激因子(hGM-CSF)可刺激骨髓细胞的生成和功能活性, 对一些临床上用细胞毒抗癌药引起的骨髓抑制及先天性嗜中性粒细胞生成障碍等病人, 有较快升高粒细胞, 减轻病情的作用^[1~3]。而国内目前尚无快速、灵敏、特异检测此类生物制剂体内药代动力学的方法。本实验用灵敏的夹心酶联免疫吸附实验(ELISA)方法, 研究了 hGM-CSF 在大鼠体内的吸收、分布、排泄等药代动力学特性。

材料及方法

动物 Wistar 大鼠, 体重 140~180 g, 雄性。为中国医学科学院肿瘤医院动物室提供。

药品与试剂 hGM-CSF 华北制药厂提供, 白色粉剂, 300 μg /瓶, 溶于生理盐水。阳性对照药: 生白能(leucomax, γ HuGM-CSF), 由 Schering-Plough 公司提供。

抗 hGM-CSF 单克隆抗体(Anti-hGM-CSF monoclonal antibody); 牛血清白蛋白(BSA); 吐温-20(Tween-20); 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)(ABTS 试剂), 均由 Boehringer Mannheim GmbH 公司提供。兔抗人 hGM-CSF 血清(rabbit anti-hGM-CSF)由华北药厂提供; 生物素化的羊抗兔 IgG 购自华美生物公司; Streptavidin 生物素化的辣根过氧化物酶复合物(streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex)为 Amersham 公司产品。

仪器 MR700型酶标仪, 为 Dynatech Laboratories 公司产品; 药代动力学参数计算用中国药理学学会编制的 3P87 药代动力学程序模拟计算。

生物样品制备

血液 给药后不同时间将动物断头取血, 静置后分离血清, 置 -20°C 备用。

尿 取不同时间间隔内的总尿液, -20°C 保存。

实验方法 夹心酶联免疫法(ELISA)测血、尿中 hGM-CSF^[4]。

鼠抗人 hGM-CSF 单克隆抗体,用磷酸缓冲液(PBS)稀释,按每孔 200 ng/40 μ l 包被 96 孔板,室温过夜。用含 1% BSA 的 PBS 封闭,室温,6 h。用去离子水洗板, -20 $^{\circ}$ C 存放。加 150 μ l 血清或组织上清液或尿液,4 $^{\circ}$ C 反应,过夜。用洗涤缓冲液(含 0.1% Tween-20 的 PBS)洗板。加兔抗人 hGM-CSF 血清(用 EDB buffer 1:100 稀释,EDB buffer: 含 0.1% Tween-20(v/v)及 0.1% BSA(w/v)的 PBS),室温置 3 h。加生物素化的羊抗兔 IgG(用 EDB 1:500 稀释),室温置 1 h。用洗涤缓冲液洗板。加 streptavidin-生物素化的辣根过氧化酶复合物(用 EDB 1:1000 稀释)100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 40 min。加显色剂 ABTS 溶液(500 μ g \cdot ml⁻¹ ABTS 溶于 100 mmol \cdot L⁻¹ 柠檬酸, pH 4.2, 加 30% H₂O₂ 3 μ l \cdot ml⁻¹, v/v) 150 μ l, 18 $^{\circ}$ C, 30~60 min 内在 MR700 型酶标仪上测吸收度,检测波长: 450 nm。

实验结果

方法的灵敏度

用上述方法包被酶标板,将 hGM-CSF 依下述浓度加入正常大鼠血清中,从 300 ng \cdot ml⁻¹, 100 ng \cdot ml⁻¹ 依次等倍稀释至 0.06 ng \cdot ml⁻¹,按上述方法检测。最低检测灵敏度为 0.4 ng \cdot ml⁻¹ (本底加 3SD)。在 12.5~0.39 ng \cdot ml⁻¹ 范围内检测呈线性相关, $Y = 0.5408 + 0.4620 \log X$, 相关系数 $\gamma = 0.9946$, 图 1 示 hGM-CSF 标准曲线。

方法的特异性

对正常大鼠血清中加入一些潜在的干扰因素观察本法检测 hGM-CSF 的特异性,如图 2 所示。在大鼠血清中不加 hGM-CSF,而加 IL-2、小牛血清、RPMI 1640 及不加任何物质的空白大鼠血清,均未检测到 hGM-CSF。而加 IL-2、小牛血清,同时加 hGM-CSF 并不影响 hGM-CSF 的相对吸收度,说明本方法具有很高的特异性。

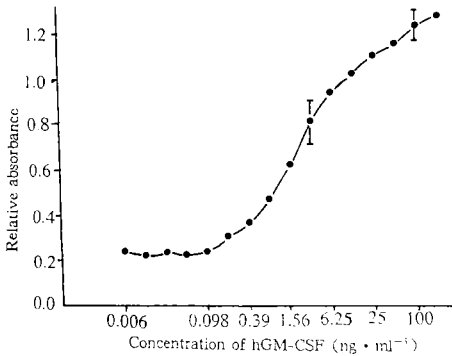


Fig 1 Standard curve of hGM-CSF in serum measured by ELISA. Lower limit of sensitivity was established at 3SD above the mean background level. Results are expressed as the mean of triplicates \pm s. Serum background level was determined from the mean measurements from six wells containing serum alone (\pm s).

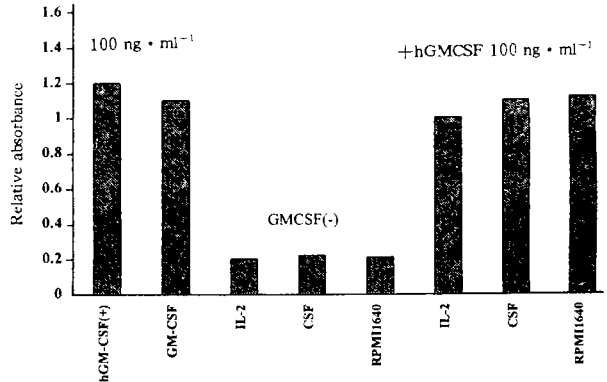


Fig 2 Effect of adding potential interfering substances to serum with or without hGM-CSF was assessed by ELISA. The assay was performed in rat serum containing either no hGM-CSF or with hGM-CSF 100 ng \cdot ml⁻¹ (GM-CSF) (+); leucomax rhuGM-CSF, Schering-Plough Co. IL-2, 100 ng \cdot ml⁻¹, CS; calf serum 10%, RPMI 1640 10%. Results are expressed as average results of triplicates \pm s.

hGM-CSF sc 后药代动力学参数

取大鼠81只,每时间点3只,sc hGM-CSF $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,按15, 30 min 及1, 2, 3, 6, 10, 16, 24 h, 共9个时间点断头取血,制备血清后测定每个时间点中 hGM-CSF 的含量。血清药物浓度—时间曲线见图3,经二室模型拟合,动力学参数见表1。

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of hGM-CSF in rats after sc injection of 50, 100 and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Results are expressed as the mean of 9 determinations from 3 rats

Parameter	Dose ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)		
	50	100	200
K_a (h^{-1})	1.34	1.54	1.35
$T_{1/2\alpha}$ (h)	0.72	0.70	0.80
$T_{1/2\beta}$ (h)	8.77	8.87	5.58
$T_{1/2}K_a$ (h)	0.52	0.45	0.51
K_{12} (h^{-1})	0.41	0.44	0.33
K_{21} (h^{-1})	0.16	0.17	0.30
K_{10} (h^{-1})	0.46	0.45	0.35
$Cl_{(s)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.67	1.07	1.32
V_c ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	1.44	2.36	3.70
AUC ($\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$)	74.90	93.28	151.35
C_{max} ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	15.76	20.19	27.51
T_{max} (h)	0.93	0.86	1.14

hGM-CSF sc 后药物的排泄

大鼠 sc $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ hGM-CSF 后于不同时间收集尿,测各时间点 hGM-CSF 的排泄量,换算成各时间点 hGM-CSF 的累积排泄率。结果表明,sc 给药0~24 h后,hGM-CSF 从尿中的排出很少,sc 给药排出率0.108%(图4)。

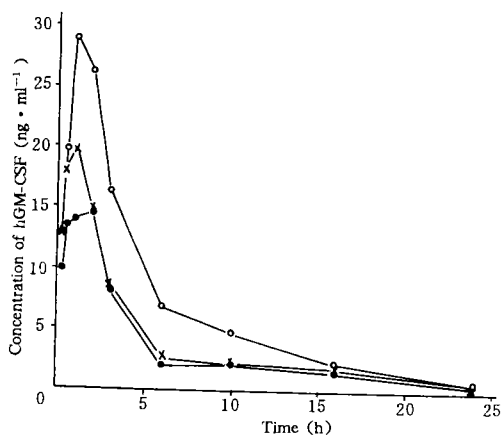


Fig 3 Serum concentration — time curve of hGM-CSF in rats after sc injection of $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (●—●), $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (×—×) and $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (○—○). Serum levels are expressed as means of 9 determinations from 3 rats. hGM-CSF was injected at time 0.

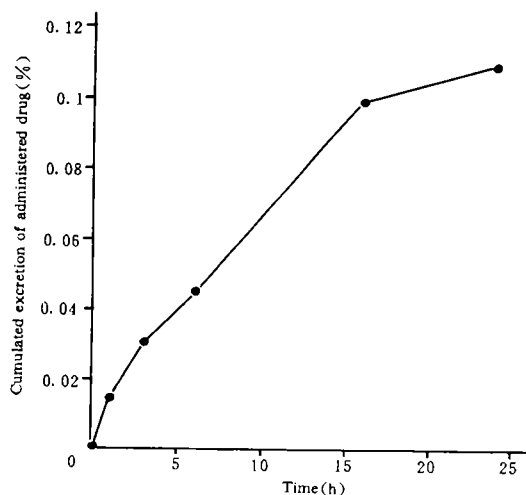


Fig 4 Total urinary excretion of hGM-CSF in rats after sc injection of $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Each point is mean value of 9 determinations from 3 rats.

讨 论

本文首次在国内建立夹心酶联免疫法(ELISA)检测重组人粒系巨噬系集落因子(hGM-CSF)含量的方法。此方法快速、灵敏、特异性高。最低检测限为 $0.4 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$,在 $0.39 \sim 12.5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内检测呈线性相关。相关系数为0.9946。此方法检测 hGM-CSF,不受血清干扰因素影响,具有较高特异性。

生物制剂的药代动力学一般采用生物法及 ^{125}I 标记法进行。但传统生物法及 ^{125}I 标记法检测 hGM-CSF 均有许多局限性。生物法虽可检测 hGM-CSF,但不易定量进行药代动力学研究,且检测灵敏度也不高^[5],并受血清中许多因子如 G-CSF, M-CSF, IL-2, IL-3等的影响,增加或抑制骨髓细胞的集落形成率^[6,7]。 ^{125}I 标记 hGM-CSF 可定量、特异研究其药代动力学,但受同位素半衰期限制,无法随时开展实验,并且具有很大的同位素辐射及同位素污染的影响,更主要的是它无法应用于人体药代动力学研究。

采用 ELISA 法检测 hGM-CSF 的药代动力学参数,可直接用血清、原尿进行实验,不必稀释(除非检测超过最高检测线)。所有试剂可较长期保存,无污染,其特异性是由单克隆抗体决定,此鼠抗人单克隆抗体可特异性吸附血清、原尿及组织中的原型 hGM-CSF。因此可不受许多相似物质如 IL-2, G-CSF 等物质的干扰,而多价兔抗血清、多价免疫球蛋白及酶介导的反应则使反应的灵敏度大大提高。我们立足国内,对 Cobon 方法中的各种条件逐一摸索,采用已商品化的德国 Boehringer 公司的单抗及国内自制的二抗、多抗,并对反应浓度及温度及时间进行适当调整,使实验简便易行,并达到了与 Cobon 相似的灵敏度与特异性。因此此方法的建立为国内 hGM-CSF 此类生物制剂的药代动力学,特别是人体药代动力学提供了良好方法。

然而由于单克隆抗体检测的高度特异性,使 hGM-CSF 在体内的代谢产物无法用此方法检测,此为本方法研究生物制剂药代动力学的一个缺点,有待进一步研究解决。

致谢 本文在研究过程中受到本所籍秀娟教授热情帮助。

参 考 文 献

- 1 Metcalf D. The granulocyte macrophage colony stimulating factors. *Science*, 1985,299:16
- 2 Morstyn G, Campbell L, Souza LM *et al.* Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet*, 1988,1:667
- 3 Grabstein KH, Urdal DL, Tushinski RJ *et al.* Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science*, 1986,232:506
- 4 Cobon J, Dempsey P, Fox R *et al.* Pharmacokinetics of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using a sensitive immunoassay. *Blood*, 1988,72:1340
- 5 Burgess AW, Begley CG, Johnson GR *et al.* Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood*, 1987,69:43
- 6 Williams DE, Straneva JE, Cooper S *et al.* Interactions between purified murine colony-stimulating factors (natural CSF-1, recombinant GM-CSF, and recombinant IL-3) on the *in vitro* proliferation of purified murine granulocyte-macrophage progenitor cells. *Exp Hematol*, 1987,15:1007

- 7 Santoli D, Yang YC, Clark SC *et al.* Synergistic and antagonistic effects of recombinant human interleukin IL-3, IL-1 alpha and granulocyte and macrophage colony-stimulating factors (G-CSF and M-CSF) on the growth of GM-CSF-dependent leukemic cell lines. *J Immunol*, 1987, **139**:3348

STUDY ON PHARMACOKINETICS OF HUMAN GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR (hGM-CSF) IN RATS USING A SENSITIVE IMMUNOASSAY (ELISA)

XQ He, XH Lei and R Han

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

ABSTRACT A sensitive and reliable sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) has been developed for determination of concentration of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF). The assay is quantitative between $0.39 \sim 12.5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ for bacterially synthesized hGM-CSF in rat serum and urine. The method was shown to be highly specific and did not significantly alter the determination when adding some potential interfering substances. After single sc injection of hGM-CSF 50, 100 or $200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, a high hGM-CSF level was detected about 15 min in rat serum, the highest level of hGM-CSF was two apparent phases with half-lives $T_{1/2\alpha}$ of 0.72, 0.70, 0.80 h and $T_{1/2\beta}$ of 8.77, 8.87 and 5.58 h. A detectable urinary excretion occurred after sc injection of hGM-CSF $200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, but the total urinary excretion of unchanged hGM-CSF was very low.

Key words hGM-CSF; Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); Pharmacokinetics