

2 种测定 TNK-tPA 生物学活性测定方法的比对分析*

丁有学, 史新昌, 毕华, 陶磊, 饶春明**

(中国食品药品检定研究院 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要 目的:应用 2 种溶栓活性检测方法检测重组人组织型纤溶酶原激活剂 TNK 突变体(recombinant TNK mutant of human tissue-type plasminogen activator, TNK-tPA)生物学活性并统计分析两者结果是否一致。**方法:**采用纤维蛋白平板溶圈法和气泡上升法测定 TNK-tPA 生物学活性,并对结果进行统计分析。**结果:**纤维蛋白平板溶圈法测定结果几何均数为 2.89×10^4 IU·支⁻¹,气泡上升法测定结果几何均数为 2.95×10^4 IU·支⁻¹。经 *t* 检验分析,2 种方法检测结果无显著性差异($P > 0.05$)。经置换检验(permutation test)分析,2 种方法检测结果数据相当(接受度概率约为 90%)。**结论:**2 种方法均可用于实验室的常规检验,但建议对于 TNK-tPA 的生物学活性检测使用气泡上升法。

关键词: TNK-tPA; 生物学活性; 溶圈法; 气泡上升法; 置换检验

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)12-2213-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.12.23

Comparative analysis to two biological activity detecting methods of TNK-tPA*

DING You-xue, SHI Xin-chang, BI Hua, TAO Lei, RAO Chun-ming**

(Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: Two thrombolytic activity methods of recombinant human tissue type plasminogen activator mutant (TNK-tPA) were carried out and the results were analyzed to deduce if the results were similar. **Methods:** The biological activity of TNK-tPA was determined by dissolution-ring method and bubble-rising method, and the results were analyzed statistically. **Results:** The geometric mean of dissolution-ring method was 2.89×10^4 IU per vial and the geometric mean of bubble-rising method was 2.95×10^4 IU per vial. *T* test analysis showed that there was no significant difference between the two methods ($P > 0.05$). According to permutation test, the data of the two methods were similar to each other (acceptance probability was about 90%). **Conclusion:** The both two methods can be used for routine laboratory tests. But the bubble-rising method was used for detecting the biological activity of TNK-tPA.

* 科技重大专项“生物类似药物质量相似性评价体系建设研究(2015ZX09501008-001)”资助项目

** 通信作者 Tel: (010) 67095380; E-mail: raocm@nifdc.org.cn

第一作者 丁有学 Tel: (010) 67095384; E-mail: dingyx@nifdc.org.cn

史新昌 Tel: (010) 67094604; E-mail: shixc@nifdc.org.cn

Keywords: recombinant human tissue type plasminogen activator mutant (TNK-tPA); biological activity, dissolution-ring method; bubble-rising method; permutation test

溶栓是治疗急性心肌梗死的重要手段^[1-2],溶栓药物能够使纤溶酶原转化为纤溶酶,纤溶酶能溶解血栓中的纤维蛋白,从而使血管再通。针对组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)进行研究的溶栓药物已发展到第三代^[3-4]。

第一代重组 t-PA 类溶栓药是由美国基因泰克公司研制的重组人组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA),该药虽然疗效好,但半衰期非常短^[5-6];第二代是由德国 BM(宝灵曼)公司开发的组织型纤溶酶原激活剂缺失变异体(r-PA),相比于第一代 rt-PA,其半衰期延长了 4~5 倍^[7];第三代是由美国基因泰克公司研制的点突变体(TNK-tPA),相比于第一代 rt-PA,降低了血浆清除速度,半衰期延长 4 倍,结合能力增强 10~14 倍,对抑制剂 PAI-1 的拮抗能力增强 80 倍^[8-9],无抗原性,不引起过敏反应,具有溶通率高、特异性强、出血风险低等特点^[10]。

目前,国产 TNK-tPA 已经获批并投放市场,质量控制贯穿于产品从研发到生产的整个生命周期中,生物学活性是产品有效性的主要控制指标。实验室用于定量测定溶栓活性的方法依然是传统的纤维蛋白平板溶圈法^[11-13]和气泡上升法^[14-15],为了更好地控制产品质量,将 2 种方法进行了对比分析。

1 材料与方法

1.1 标准品及供试样品

活性测定标准品、供试样品重组人组织型纤溶酶原激活剂 TNK 突变体(TNK-tPA)由企业提供。

1.2 主要试剂及仪器

电泳级高强度琼脂糖、人纤维蛋白原(货号: F-4753,批号: SLBG1274V)、人纤溶酶原(货号: P7999-10 UN)为 SIGMA 公司产品;人凝血酶为中国食品药品检定研究院制备的国家标准品(批号 20021105; 127 IU·支⁻¹); Na₂HPO₄·12H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、NaN₃ 均为国产分析纯;无菌生理盐水为石家庄四药有限公司产品;精密天平(0.01 mg)为 Sartorius 公司产品;数显三用恒温水浴箱为江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司产品;恒温培养箱为 MMM 公司产品。

1.3 溶液的制备

1.3.1 稀释液 称取 Na₂HPO₄·12H₂O 17.4 g, NaH₂PO₄

·2H₂O 1.778 g, NaN₃ 0.1 g,加入超纯水充分溶解后,定容至 1 000 mL,加入少许 NaH₂PO₄·2H₂O 调节 pH 至 7.2。

1.3.2 凝血酶标准品 用稀释液将凝血酶标准品溶解并稀释为 100 IU·mL⁻¹和 30 IU·mL⁻¹ 2 个浓度备用,分装后 -20 °C 保存。

1.3.3 纤维蛋白原 分别称取纤维蛋白原 130 mg 和 20 mg,分别加入稀释液 10 mL,放入 37 °C 水浴中,不可摇动,待充分溶解,浓度为 13 mg·mL⁻¹和 2 mg·mL⁻¹,现用现配。

1.3.4 纤溶酶原 用稀释液 1.0 mL 将纤溶酶原溶解,按标示装量稀释为 0.5 mg·mL⁻¹和 0.1 mg·mL⁻¹ 2 个浓度,分装后 -20 °C 保存。

1.4 溶圈法

称取琼脂糖 150 mg,加入生理盐水 23 mL,煮沸溶解,60 °C 水浴平衡,加入浓度为 100 IU·mL⁻¹凝血酶 20 μL,加入浓度为 0.5 mg·mL⁻¹纤溶酶原 300 μL,边加边摇匀,加入浓度为 13.2 mg·mL⁻¹纤维蛋白原 1 mL,摇匀,混浊后马上倒入直径 9 cm 的平板中,水平放置,充分凝固后,放置 4 °C 冰箱至少 0.5 h,待用(应在 2 d 内使用)。将活性测定标准品用稀释液稀释至 1 000、500、250、125、62.5 IU·mL⁻¹,供试样品稀释至约 250 IU·mL⁻¹;用直径 2 mm 打孔器在制备好的纤维蛋白平板内打孔,每孔点样 6 μL,每个样品 2 复孔,放入湿盒中,置 37 °C 恒温培养箱 16 h,纵横 2 次量取溶圈直径,以标准品各个稀释度活性的对数为横坐标(X),溶圈直径的平均值(4 次量取的数值)的对数为纵坐标(Y)。利用统计学软件中的回归分析方法作标准曲线,并求得 $Y=a+bX$ 中的 a 和 b 及拟合优度(R^2)值,根据样品的溶圈直径计算样品的活性。

1.5 气泡上升法

用稀释液将活性测定标准品稀释至 3 000、1 500、750、375、187.5、93.75 IU·mL⁻¹,供试样品稀释至约 500 IU·mL⁻¹;取质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹的纤溶酶原 20 μL 与质量浓度为 2 mg·mL⁻¹的纤维蛋白原溶液 1 mL 混合,冰浴保存备用(以下称 A 液);取活性标准品或供试样品 120 μL 与浓度为 30

IU·mL⁻¹的凝血酶溶液 120 μL 混合,冰浴保存备用(以下称 B 液);取 B 液 200 μL,加入 A 液中快速混匀,置 37 °C 水浴中,开始用秒表计时,当气泡全部上升至表面时为终点,记录时间。以各稀释度标准品活性的对数为横坐标(X),气泡上升时间的对数为纵坐标(Y),利用统计学软件中的回归分析方法作标准曲线,并求得 $Y=a+bX$ 中的 a 和 b 及拟合优度(R^2)值,根据样品的气泡上升时间可求得样品的活性。

1.6 统计分析

数据经 t 检验和置换检验分析^[16-17](自制)。

2 结果

2.1 溶圈法

用活性测定标准品绘制标准曲线,所测数据符合直线回归方程 $Y=0.174 2+0.584 9X$ ($r^2=0.992 6$),见图 1。不同时间内测得 TNK-tPA 供试样品生物学活

性 8 次结果几何平均值为 2.89×10^4 IU·支⁻¹, GCV-1 为 9.71%。结果见表 1。

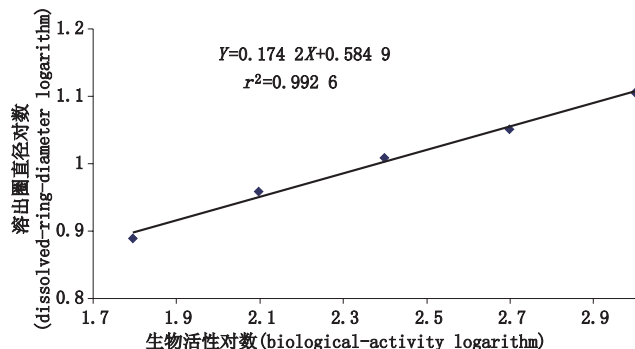


图 1 溶圈法测定标准曲线

Fig. 1 Standard curve of dissolving-ring method

注(notes):对数值没有单位,转换前生物学活性单位为 IU·mL⁻¹,转换前时间的单位为毫米(There is no unit for the logarithm value. The biological activity unit before conversion is IU·mL⁻¹, and the length before conversion is millimeter)

表 1 2 种方法测定的 TNK-tPA 生物学活性结果

Tab. 1 TNK-tPA biological activity results measured by two methods

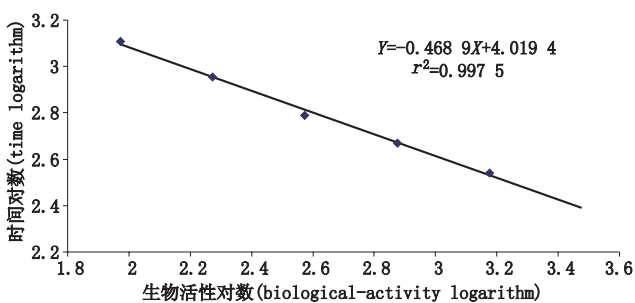
溶圈法(dissolving-ring method)		气泡法(bubble-rising method)	
检测结果 (detection results)	检测结果对数值 (logarithm value of detection result)	检测结果 (detection result) 1.00 × 10 ⁴ IU per vial	检测结果对数值 (logarithm value of detection result)
2.88	0.459 4	2.96	0.471 3
3.22	0.507 9	3.03	0.481 4
2.77	0.442 5	2.81	0.448 7
3.15	0.498 3	2.66	0.424 9
2.52	0.401 4	3.17	0.501 1
2.71	0.433 0	2.94	0.468 3
2.73	0.436 2	3.08	0.488 6
3.24	0.510 5	3.02	0.480 0
几何均数 (geometric mean)	2.89	2.95	
GCV-1/%	9.7	5.7	

2.2 气泡法

测得活性标准品数据符合直线回归方程 $Y=-0.468 9+4.019 4X$ ($r^2=0.997 5$),见图 2。不同时间内测得 TNK-tPA 供试品生物学活性 8 次结果几何平均值为 2.95×10^4 IU·支⁻¹, GCV-1 为 5.7%。结果

见表 1。

2 种方法检测结果,经方差齐性检验,方差齐($P>0.05$);经 t 检验分析, $t=0.475$, 小于 t 界值, 2.145 (双侧, 自由度=14, 显著水平=0.05), $P=0.64$ 大于 0.05, 故 2 种方法检测结果差别不显著。



注 (notes): 对数值没有单位, 转换前生物学活性单位为 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 转换前时间的单位为 s (There is no unit for the logarithm value. The biological activity unit before conversion is $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the time before conversion is a second.)

图 2 气泡法测定标准曲线

Fig. 2 Standard curve of bubble-rising method

2 种方法检测结果转换为对数后, 经方差齐性检验, 方差齐 ($P > 0.05$); 经 t 检验分析, $t = 0.530$, 小于 t 界值 2.145 (双侧, 自由度 = 14, 显著水平 = 0.05), $P = 0.60$ 大于 0.05, 故 2 种方法检测结果差别不显著。

经置换检验分析, 2 组数据间差值分布的标准差为 $0.30 \times 10^4 \text{ IU} \cdot \text{支}^{-1}$, 2 组数据平均值差值为 $0.056 \times 10^4 \text{ IU} \cdot \text{支}^{-1}$, 在约 90% 接受度下, 以落入数据间差值分布 0.2SD 范围, 即 $\leq 0.06 \times 10^4 \text{ IU} \cdot \text{支}^{-1}$, 差值小于 2 组数据均值的 2%, 2 组数据相当。

3 讨论

虽然文献报道的溶栓药物生物学活性测定方法较多, 如纤维蛋白平板溶圈法、发色底物法、酶联纤维蛋白溶解法、气泡上升法、酶联免疫吸附法等^[18-19], 但目前实验室用于定量测定溶栓活性的方法仍然是纤维蛋白平板溶圈法和气泡上升法。其原理是利用纤维蛋白原和凝血酶在体外模拟血栓, 溶栓药物可以激活游离的纤溶酶原为有活性的纤溶酶, 纤溶酶降解纤维蛋白为可溶性片段; 纤维蛋白平板法在平板上形成透明的溶解圈, 溶圈的大小跟活性成正比例关系; 气泡上升法则在试管中形成小气泡逐步上升到表面, 活性越高, 气泡上升速度越快, 全部气泡上升到表面所用的时间越短。

从实验结果来看, 2 种方法检测结果几何均值差值小于 5%, 结果一致。平板法有其操作简单, 结果比较直观的优点, 但在操作上影响因素较多, 例如琼脂糖浓度跟平板的硬度有关, 平板的软硬直接影响打孔的质量, 纤维蛋白原和凝血酶浓度跟平板的混浊度有关, 并且实验需要时间较长 (16 h 以上),

用卡尺测量直径误差较大, 易受主观因素影响; 气泡法在操作上相对影响因素较少, 操作简单, 实验周期短 (1 h 以内), 只要注意及时冰浴及 37°C 水浴时用秒表准确记录时间, RSD 较小。鉴于以上分析, 建议在 TNK-tPA 的生物学活性检测中使用气泡上升法。

2 种检测方法数据的一致性主要源于使用了同一生物学活性标准品, 虽然不同方法选取的监测指标不同, 溶圈法的溶圈直径与供试品浓度 (或稀释度) 呈正相关; 气泡法的气泡开始上升时间与供试品浓度 (或稀释度) 呈负相关, 在标准品的校正下, 排除了大部分干扰, 较好地保证了 2 种检测方法数据的一致性。

2 种数据一致性推断慎用 t 检验进行分析, 因为 t 检验设计的目的是为了分辨 2 种数据的差别, 如果数据量足够大, 差别总可见 (两均数差不为零)。

本文用到的置换检验是用 2 组数据间的差值分布作为比较基础, 来判断 2 组数据平均值所在位置, 如果其落入数据间差值分布 0.2SD (点考察参数) 的区域内, 在 90% 接受度下, 可认为 2 组数据相当。

本文分析了溶圈法和气泡法检测数据的一致, 说明 2 种检测 TNK-tPA 生物学活性的方法相当, 为 TNK-tPA 生物学活性的综合利用和一致性分析进行铺垫。

参考文献

- [1] 梁峰, 胡大一. 替奈普酶 [J]. 临床药物治疗杂志, 2003, 1(1): 58
LIANG F, HU DY. TNK-tPA [J]. Clin Med J, 2003, 1(1): 58
- [2] 焦昕, 胡大一, 梁峰, 等. 急性心肌梗死患者 TNK-tPA 与 rt-PA 溶栓出血发生率的对比研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2009, 9(4): 302
JIAO X, HU DY, LIANG F, et al. Incidence of hemorrhage in patients with acute myocardial treated with TNK-tPA versus rt-PA [J]. Eval Anal Drug-Use Hosp China, 2009, 9(4): 302
- [3] 王泽, 杜莉. 急性心肌梗死溶栓药物的进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(19): 21
WANG Z, DU L. The progress in thrombolytic drugs for acute myocardial infarction [J]. World Lat Med Inf, 2015, 15(19): 21
- [4] 鲁振华, 李永东. 急性心肌梗死溶栓药物的研究进展 [J]. 医学综述, 2016, 22(19): 3838
LU ZH, LI YD. The research progress in thrombolytic drugs for acute myocardial infarction [J]. Med Recapit, 2016, 22(19): 3838
- [5] NORDT TK, BODE C. Thrombolysis: newer thrombolytic agents and

- their role in clinical medicine [J]. *Heart*, 2003, 89(11): 1358
- [6] BOUDREAU DM, GUZAUSKAS GF, CHEN E, *et al.* Cost-effectiveness of recombinant tissue-type plasminogen activator within 3 hours of acute ischemic stroke: current evidence [J]. *Stroke*, 2014, 45(10): 3032
- [7] VERDTRAETE M, LIJNEN HR, COLLEN D. Thrombolytic agents in development [J]. *Drugs*, 1995, 50(1): 29
- [8] 徐蜀远, 季晓丽. 第三代溶栓药物 [J]. 国外医药: 合成药、生化药、制剂分册, 2001, 22(5): 301
XU SY, JI XL. The third generation of thrombolytic drugs [J]. *World Pharm Synth Drug Biochem Med Prep Fasc*, 2001, 22(5): 301
- [9] PERLER B. Thrombolytic therapies: the current state of affairs [J]. *J Endovas Ther*, 2005, 12(2): 224
- [10] VENU M, ROBERT AH, JUDITH SH, *et al.* Thrombolysis and adjunctive therapy in acute myocardial infarction: The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy [J]. *Chest*, 2004, 126(3): 549
- [11] ASTRUP T, MULLERZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40(2): 346
- [12] 中华人民共和国药典 2015 年版. 三部 [S]. 2015: 通则 3529
ChP2015. Vol III [S]. 2015: General3529
- [13] 丁有学, 李响, 韩春梅. 重组人尿激酶原质控方法和质量标准的研究 [J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(7): 515
DING YX, LI X, HAN CM, *et al.* Development of methods and standard for quality of recombinant human pro-urokinase [J]. *Chin J Biol*, 2007, 20(7): 515
- [14] 丁有学, 韩春梅, 刘兰. 重组人组织型纤溶酶原激活剂改构体指控方法的建立 [J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(7): 1015
DING YX, HAN CM, LIU L, *et al.* Study on methods for quality control of recombinant human tenecteplase [J]. *Chin J Biol*, 2013, 26(7): 1015
- [15] EP 7.0 [S]. 2008: 1170
- [16] SONDHI A, RICE KM. Fast permutation tests and related methods, for association between rare variants and binary outcomes [J]. *Ann Hum Genet*, 2018, 82(2): 93
- [17] ENDRENYI L, CHI E, CHOW SC, *et al.* Bioequivalence and biosimilarity of highly variable drugs [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(5): 803
- [18] 赵明, 潘映红, 王一丁. 溶栓活性体外检测方法概况 [J]. 中国药事, 2006, 20(2): 117
ZHAO M, PAN YH, WANG YD. Review on the *in vitro* detection method of thrombolysis activity [J]. *Chin Pharm Aff*, 2006, 20(2): 117
- [19] 魏华, 赵祥颖, 刘建军. 纳豆激酶溶栓活性的测定方法 [J]. 食品与药品, 2006, 8(8A): 59
WEI H, ZHAO XY, LIU JJ. An assay method for thrombolysis activity of nattokinase [J]. *Food Drug*, 2006, 8(8A): 59

(本文于 2018 年 10 月 8 日修改回)