

胎盘肽注射液的研制及治疗外阴白斑的疗效

佟志清¹, 杨光照¹, 汪宇¹, 宋永波² (1. 中国人民解放军第 463 医院药剂科, 辽宁 沈阳 110042; 2. 沈阳药科大学制药系, 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的: 研制胎盘肽注射液, 并观察其治疗外阴白色病变的疗效。**方法:** 以健康人胎盘为原料, 采用冻融和超滤的方法制备了胎盘肽注射液。用福林-酚法测定多肽含量。观察了该注射液对 156 例外阴白色病变患者的疗效。**结果:** 胎盘肽在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 平均回收率为 100.16%, 99.25%, 98.59%, *RSD* 分别为 1.09, 0.48, 0.50 ($n=3$)。治疗外阴白色病变的总有效率达 100%。**结论:** 胎盘肽注射液作为多肽类生化制剂, 工艺简便可行, 质量可控, 临床疗效满意。

关键词 胎盘肽注射液; 制备; 外阴白色病变; 疗效分析

中图分类号: R271.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2007)02-0091-03

Preparation and therapeutic effect on white lesion of vulva of placenta polypeptide injection

TONG Zhi-qing¹, YANG Guang-zhao¹, WANG Yu¹, SONG Yong-bo² (1. Department of Pharmacy, The 463rd hospital of PLA, Shenyang 110042, China; 2. Department of Pharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT Objective: To prepare the placenta polypeptide injection and establish the standard of quality control and to evaluate the therapeutic effect on white lesion of vulva. **Methods:** The placenta polypeptide injection was made from healthy human placenta by the method of thaw and ultrafiltration. The content of polypeptide was determined by Lowry-method. **Results:** The linear relationship of placenta polypeptide was found from 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The average recovery of polypeptide was 100.16%, 99.25% and 98.59%, respectively. *RSD* was 1.09, 0.48 and 0.50, respectively ($n=6$). The overall clinical effective rate for white lesion of vulva was 100%. **Conclusion:** The placenta polypeptide injection is simple in preparation technique and feasible in quality control. No adverse drug reactions were found and the clinical effect is satisfactory.

KEY WORDS placenta polypeptide injection, preparation, white lesion of vulva, quality control, therapeutic effect

外阴白色病变是妇科常见病, 其病因和发病机制尚不清楚, 由于其顽固瘙痒且个别病例可出现非典型增生甚至癌变, 严重影响患者身心健康。目前许多治疗方法都不够理想, 且易反复发作。本院生化制剂室研制出胎盘肽注射液, 经外阴病灶局部皮下注射治疗, 收到了良好的治疗效果。现将结果报告如下:

1 仪器与试剂

1.1 仪器 日本岛津 UV-2201 紫外分光光度计。

1.2 试剂 胎盘肽注射液 (本院药剂科生化制剂室自制, 批号为 20020512, 20021116 和 20030319); 牛血清白蛋白 (中国药品生物制品检定所提供), 水为重蒸水; 其它试剂均为分析纯。

2 胎盘肽的制备方法^[1,2]

采集新分娩 (离体 4 h 内) 的健康胎盘, 取胎盘

血作 HBV、HCV、HAV、HIV、HEV 病毒的检测, 并建立详细的档案, 备用。检查阴性者在洁净室内用清水冲洗干净, 再用纯化水、生理盐水充分洗净, 沥干称重。用消毒器皿剔除脂肪及筋膜后, 加适量生理盐水 (1:1), 于电动组织匀浆器中匀浆。匀浆液置 -30 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存, 反复冻融 3~7 次, 10 $^{\circ}\text{C}$ 以下将匀浆液超滤, 收获分子量 < 10KD 的超滤液。从超滤液中取样, 测定多肽含量, 按成品规格调整浓度及 pH 值, 将超滤液置 (60 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中连续加热 10 h, 然后除菌分装成多肽含量 1 mg/mL \pm 20% 的胎盘肽制剂。

3 胎盘肽注射液质量标准^[3,4]

3.1 鉴别 精密量取本品 0.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加新鲜蒸馏水稀释至刻度, 混匀, 照分光光度法 (中国药典 2005 年版二部附录 IV A) 测定, 在 253 nm 的波长处有最大吸收。E_{260nm}/E_{280nm} \geq 2.0。

3.2 外观检查 为近无色或极微淡黄色澄明液体, 不应有异物、混浊或沉淀。

3.3 化学检定

3.3.1 pH 值为 6.5, 符合规定。

3.3.2 蛋白质 取本品 1 mL, 加入 20% 磺基水杨酸 1 mL, 混匀, 溶液澄清, 无沉淀, 符合规定。

3.3.3 热原检查 取本品, 加氯化钠注射液稀释成每 1 mL 含 200 μg 的溶液, 依法检查(中国药典 2005 年版二部附录 XI D), 剂量按家兔体重每 1 kg 静脉注射 1 mL, 3 只家兔体温分别升高 0、0.1、0.3 $^{\circ}\text{C}$, 符合规定。

3.3.4 多肽含量测定

3.3.4.1 线性范围的测定 取 14 支试管分成两组, 分别加入 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 标准蛋白质溶液(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 用水补足到 5.0 mL, 分别精密量取 1 mL, 加入 5 mL Folin-酚试剂甲, 室温放置 10min, 加 Folin-酚试剂乙 0.5 mL, 混匀, 于 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min, 在 660 nm 波长处比色。测定光密度值。取两组测定的平均值, 以蛋白质浓度对光密度值求得回归方程为: $A = 0.026C + 0.4165$ ($r = 0.9995$), 蛋白质浓度在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 成线性关系。

3.3.4.2 样品测定 取样品 1 mL 加纯化水稀释, 制成每 1 mL 中约含多肽 60 μg 的溶液, 精密量取 1 mL, 测定方法同 3.3.4.1, 在标准曲线上查得多肽含量, 乘以稀释倍数, 计算出未知样品的浓度, 结果显示, 批号为 20020512, 20021116 和 20030319 的胎盘肽注射液含量分别为 0.96 mg/mL, 1.15 mg/mL, 1.03 mg/mL。

3.3.4.3 回收率实验 本品采用加入法测定其回收率。取两批已知含量的胎盘肽注射液, 将牛血清白蛋白溶液(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 约按胎盘肽注射液含量的 50%、100%、120% 加入胎盘肽注射液中, 按照 3.3.4.2 项下测定多肽含量, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 胎盘肽注射液回收率测定结果 ($n=3$)

批号	加入量 (mg/mL)	测得量 (mg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
20020512	0.50	0.52	103.12	100.16	1.09
	1.00	0.98	98.00		
	1.25	1.24	99.37		
20021116	0.50	0.49	98.95	99.25	0.48
	1.00	0.99	99.00		
	1.25	1.24	99.81		
20030319	0.50	0.49	98.03	98.59	0.50
	1.00	0.99	99.00		
	1.25	1.23	98.75		

3.3.4.4 稳定性实验 取批号为 20020512 的胎盘肽注射液在避光 0 $^{\circ}\text{C}$ ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别于 0、4、8、12、24 h 按照 3.3.4.1 项下进行含量测定, 测得 0 ~ 24h

含量的 RSD 值为 0.95%。实验结果显示样品含量在 24h 内稳定。

3.3.4.5 精密度实验 取样品溶液, 在上述条件下重复测定 5 次, 以样品吸光度计算相对标准偏差, RSD 为 0.85%。

3.3.5 异常毒性 取本品, 加氯化钠注射液稀释成每 1 mL 200 μg 的溶液, 依法检查(中国药典 2005 年版二部附录 XI C), 按静脉注射法给药, 5 只小鼠在 48h 内无死亡, 符合规定。

3.3.6 过敏实验 取体重 250 ~ 300 g 的健康豚鼠 6 只, 间日腹腔注射本品 0.5 mL, 连续 3 次, 放置 2 周后, 再自股静脉注射本品 1.0 mL, 注射后 15 min 内, 未发生竖毛、呼吸困难、喷嚏、干呕罗音、抽搐、虚脱或死亡现象, 判断未出现过敏反应。

3.3.7 活力测定(淋巴细胞 E 玫瑰花结试验) 取本品, 依法检查(《中国生物制品规程》一部 1995 年版试行规程 43 页), 样品管比对照管玫瑰花结平均百分率提高 36%。

3.3.8 其他 应符合注射剂项下有关的各项规定(中国药典 2005 年版二部附录 IB)。

4 治疗外阴白色病变疗效分析

4.1 观察对象 选自 1998 年 6 月至 2002 年 12 月来院就诊患者, 均为经病理检查证实的外阴白色病变患者, 共 156 例, 根据 1987 年国际外阴疾病学会(ISSVD) 新命名法分为: 硬化苔癣型 81 例, 鳞形细胞增生型 75 例, 患者年龄最大为 71 岁, 最小为 18 岁, 平均年龄为 43.60 岁, 平均病程为 7.8 年, 病程最短为 5 个月, 最长为 16 年。

4.2 方法

4.2.1 治疗方法 采用本院生化制剂室研制的胎盘肽注射液, 进行外阴病灶局部点状皮内注射, 隔日一次, 每侧病灶注射 4 mL, 10 次为 1 疗程, 视疗效而重复疗程。通常仅需治疗 1 疗程, 最长治疗 3 疗程, 每个疗程间隔 5 d。疗程结束后, 即判定疗效。

4.2.2 诊断标准 ①临床检查: 外阴局部有色素脱失, 萎缩或苔癣样增生所见。②病理检查: 病灶局部取材送病理检查, 可见上皮增生或变薄。角化过度, 棘细胞增厚, 钉角延长或消失等。

4.2.3 监测指标 ①治疗前、后做局部病理检查。②部分病例治疗前做免疫学检查。

4.2.4 近期疗效判定 治愈: 症状消失, 外阴皮肤黏膜颜色及弹性基本恢复正常, 治疗结束后随访半年无复发。显效: 症状部分消失, 皮肤弹性明显改善, 病变区域皮肤变粉红色。无效: 症状未消失, 外阴皮肤无改变。

4.3 结果 156例外阴白色病变经胎盘肽注射液治疗后的疗效分析分别见表2、表3和表4。

表2 胎盘肽注射液治疗156例外阴白色病变临床症状改善情况

症状	总例数(%)	消失数(%)	缓解数(%)	无变化(%)
瘙痒	146(93.6)	134(91.8)	12(8.4)	0(0)
皲裂	53(33.9)	52(97.3)	1(2.7)	0(0)
溃疡	28(81.8)	27(96.4)	11(3.6)	0(0)
颜色改变	151(96.8)	77(51.2)	74(48.8)	0(0)
弹性降低	139(89.1)	69(49.7)	66(47.5)	4(2.8)

表3 156例外阴白色病变病理分型与近期疗效分析

	总例数	治愈(%)	显效(%)	无效(%)
鳞形细胞增生型	75	45(60.0)	30(40.0)	0(0)
硬化苔癣型	81	42(51.8)	39(48.2)	0(0)
合计	156	87(55.8)	69(44.2)	0(0)

表4 156例外阴白色病变病理分型的年龄分布与疗效分析

组别 (岁)	鳞形增生型				硬化苔癣型			
	例数	治愈	显效	无效	例数	治愈	显效	无效
16~20	3	1	0	0	2	2	0	0
21~30	5	4	1	0	13	8	5	0
31~40	23	13	10	0	29	15	14	0
41~50	27	15	12	0	21	10	11	0
51~60	11	7	4	0	7	3	4	0
61~70	6	4	2	0	8	4	4	0
>70	2	1	1	0	1	0	1	0
合计	75				81			

5 讨论

5.1 在胎盘肽注射液的生产过程中对鲜胎盘的原料及生产工艺有着非常严格的要求:胎盘必须取自健康产妇,凡患有肝炎、恶性肿瘤、免疫缺陷症、艾滋病、性病(梅毒、淋病)、急性传染病、人工流产、死胎、各种畸形儿胎盘、外观不正常、保存和运输不妥而变质者均不能使用;胎盘娩出后立即取脐血,在24h内作HBV等各项病毒检测;工艺过程中,采用了国际通用的60℃,水浴灭活10h等病毒灭活工艺。

5.2 胎盘中活性成分众多,包括人胎盘免疫调节肽

(HPIF,又名胎盘肽 PIP、人胎盘因子、人胎盘转移因子)、人胎盘谷胱甘肽 S-转移酶(CST-π 抗体)以及其他抗体、β 干扰素(IFN-β)、类似凝血因子的纤维蛋白稳定因子、含氮脂多糖、红细胞生成素等。还有多种激素、多种酶(如溶菌酶、组胺酶),另含有15种化学元素和微量元素^[5]。胎盘肽是一种无色透明、可透析、可超滤、不耐热的多肽,蛋白质反应阴性,分子量为3 800~5 000,内含17个氨基酸。胎盘肽注射液是采用现代生物技术,从健康产妇胎盘中提取的多肽注射液,主要含多种生物活性的氨基酸和肽类,有研究认为外阴营养不良与免疫功能低下有关,胎盘肽注射液治疗外阴营养不良取得较好疗效同时也证明胎盘肽注射液具有提高机体免疫功能的作用。

5.3 采用胎盘肽注射液治疗外阴白色病变疗效显著,本研究中,对156例患者的治疗结果显示,治愈率可达55.8%,有效率达100%,观察中发现,此治疗方法不受年龄及病理分型的影响,各治愈率无显著差异(P>0.05),在各种症状中,对瘙痒、皲裂和溃疡的改善较明显,这三种症状的消失数分别为134例,52例和27例,颜色和弹性的改善较困难。在治疗中发现,采用皮内注射胎盘肽注射液症状改善较快,多数患者对疼痛能够忍受,个别患者不能忍受可加1支利多卡因注射液。

参考文献:

[1] Lawrence HS. Experimental study of placental immunoregulation factor[J]. Immun, 1990,11:195.
 [2] 张光曙. 胎盘转移因子的研究与应用[M]. 北京:中国科学技术出版社,1992:3.
 [3] 中国药典[S]. (2005年版二部):附录,2005:6,22,84,85.
 [4] 中国生物制品规程[S]. 1995年版,1995:43.
 [5] 骆和生,罗鼎辉. 免疫中药学——中药免疫药理与临床[M]. 北京:中国协和医科大学北京医科大学联合出版社,1999:87

收稿日期:2006-03-27

(上接第90页)

[10] Barnes PJ, Pauwels RA. Theophylline in the management of asthma: time for reappraisal[J]. Eur Respir J, 1994, 7:579.
 [11] 杜耀广. 茶碱临床应用的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1998, 21:196.
 [12] 钟南山, 徐军. 茶碱类药物在治疗哮喘及慢性阻塞性肺疾病中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1998, 21:6.
 [13] 陈莉. 氨茶碱对支气管哮喘外周血T淋巴细胞亚群比值影响的临床观察[J]. 医师进修杂志, 1997, 20:317.
 [14] Kips JC, Tavernier JH, Peleman RA, et al. Effect of theophylline on endotoxin and tumor necrosis factor induced airway changes in an *in vivo* animal model[J]. Int Arch Allergy Appl Immunol,

1992, 99:478.
 [15] Kips JC, Tavernier J, Parwel R. Tumor necrosis factor (TNF) causes bronchial hyperresponsiveness in rats[J]. Am Rev Respir Dis, 1992, 145:332.
 [16] Mary D, Aussel C, Ferrua B, et al. Regulation of interleukin-2 synthesis by cAMP in human T-cells[J]. J Immunol, 1987, 139:1179.
 [17] 杨藻宸. 医用药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1997:635.
 [18] 汤光, 李大魁. 现代临床药理学[M]. 北京:化学工业出版社, 2003:467.
 [19] 徐叔云. 临床药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993:546.

收稿日期:2006-06-16