

• 专家论坛 •

聚乙二醇化蛋白类药物的药代动力学

刘昌孝 蔡永明

【摘要】 聚乙二醇化蛋白质药物的研究开发是改善蛋白药物药代动力学、药效学、毒性和安全性的重要研究领域。本文通过文献资料分析聚乙二醇和聚乙二醇-蛋白质类药物与药代动力学(包括分布、代谢、消除)的关系,认识聚乙二醇化药物的药代动力学对聚乙二醇化蛋白质药物的有效性、毒性、安全性的影响。本文利用聚乙二醇化集落刺激因子长效制剂在比格犬的药代动力学与药效学和聚乙二醇化重组干扰素变异体在猕猴的药代动力学研究结果。

【关键词】 聚乙二醇化蛋白质药物; 药代动力学; 药效动力学; 分布; 消除; 安全性

【中图分类号】 R969.1 **【文献标志码】** A

【文章编号】 1008-9926(2012)01-001-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1008-9926.2012.01.01



刘昌孝 药代动力学专家。研究员、博士生导师。1992 年获国务院津贴, 2000 年获得香港紫荆花医学成就奖。2003 年当选为中国工程院院士。致力于新药研究, 承担近 30 多项国家重大科技项目(国家 973、863、国家科技攻关计划等), 获得国家部省成果奖 32 项次, 获国际奖 5 项。发表中英文论文 320 余篇, 中英文专著 16 部。

近年来, 聚乙二醇(PEG)-蛋白质类药物开发数量明显增加, 是一活跃的研究领域, 特别在设计、制备、纯化等方面丰富了这类药物的研究^[1-5], 对其临床前和临床应用安全性的知识与认识, 使评价 PEG-蛋白质类新药的药代动力学、代谢和消除以及与药效和安全性等的研究很重视^[6-12], 特别在治疗肝炎的药物干扰素 PEG 化研究成绩斐然^[13-20]。然而在 PEG 化蛋白类药物的代谢、组织分布和排泄研究仍然具有挑战性, PEG 化药物安全性、有效性以及代谢机制与安全性和有效性的关系仍然很复杂, 如 PEG 化干扰素的代谢研究, 就明确表明不论支链还是直链的 PEG 与药物结合形成的长效干扰素, PEG 均可通过粪或尿排泄, 而不在体内积蓄^[21]。本文旨在讨论 PEG 化蛋白质药物的药代动力学和药效学性质、体内组织分布与排泄研究方法、代谢与安全性问题, 还以我们的研究实例揭示药动学与药效学等相关研究结果。

1 PEG 化改善蛋白质药物的药代动力学和药效学性质

化学修饰是延长蛋白质药物半衰期的有效途径

基金项目: 国家 973 项目, No. 2010CB735602, 2012CB724002; 国家重大新药创制项目, No. 2011ZX09102-009-002, 2012ZX09304-002

作者简介: 刘昌孝, 研究员。研究方向: 创新药物药代动力学和临床药理学评价研究。E-mail: liuchangxiao@163.com

作者单位: 300193 天津, 天津药物研究院释药技术与药代动力学国家重点实验室

之一, 是一种将分子量小的蛋白质药物共价连接到较大分子量的分子上的方法, 例如 PEG 和白蛋白, 共价连接到小分子蛋白上能减小免疫原性, 改善可溶性和生物学利用度, 增加抗蛋白水解作用, 同时也能够延长半衰期。PEG 是由环氧乙烷聚合而成的大分子聚合物, PEG 类修饰剂和其他修饰剂相比, 具有无毒性, 良好的溶解性, 免疫原性低, 且分子量范围较宽, 种类选择较多等优点。而且 PEG 可以将它的许多优良特性赋予修饰后的生物分子。经聚乙二醇共价修饰后, 蛋白质药物的相对分子质量显著增加, 延缓了药物排泄, 提高了药物抵抗酶解的能力, 增加了其稳定性, 并降低了免疫原性, 这些改变均有利于延长药物在体内的半衰期、增加体内活性, 从而可明显改善蛋白质药物的药代动力学和药效学性质。

2 PEG-蛋白质体内组织分布与排泄研究方法

通常采用同位素标记以及同位素标记结合高效液相色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳、酸沉淀等方法研究生物技术新药的体内组织分布和排泄。各种同位素, 尤其是常用的¹³¹I、³H 等, 标记氨基酸分子均不甚稳定, 容易脱落, 如在人体内给予¹³¹I 标记人生长激素(同位素标记在氨基酸上), 给药后数分钟血浆中就出现游离¹³¹I, 而给药后 6~90 min 游离¹³¹I 已占血浆总放射性的主要部分; 此外, 标记同位素的氨基酸有可能在体内被重新利用而掺入其他内源蛋白或循环摄取定位于组织, 如大鼠给予标记³H-亮氨酸或重

组人³H-生长激素时,发现重组人³H-生长激素的放射性标记在组织中的分布模式与³H-亮氨酸相似,提示氚标记生长激素的氨基酸重新掺入至内源蛋白^[22]; ¹³¹I-¹⁴C等同位素都可以标记 PEG 分子,最常用的方法是同位素与 PEG 分子末端的羟基(-OH)结合^[23-26]。此外,采用质谱等方法通过直接检测 PEG 和其代谢产物的方法研究 PEG-蛋白质的体内组织分布与排泄,更易受到交叉反应和机体(人或动物)通过各种途径摄入体内的外源性 PEG 的严重干扰;因此,目前研究 PEG-蛋白质体内组织分布和排泄试验的方法存在明显的缺陷和限制^[24]。

分子量大于 20 000 的 PEG 分子所偶联形成的 PEG-蛋白质,其体内的血浆清除半衰期较长,常常大于 20 h 以上,这种大分子量的 PEG-蛋白质主要还是以原型形式从肾脏和/或胆汁(少量)中排泄,但因其排泄速度较小分子量(小于 5 000) PEG 明显降低,排泄时间明显延长,尿液或胆汁中的浓度显著降低,使现有的方法更难检测到其浓度和分子的完整性。此外,PEG-蛋白质分子在血液循环中的稳定性或完整性也较难确定,不排除有蛋白酶降解、PEG 链脱落或断裂的可能。

3 PEG 的代谢与安全性

3.1 PEG 的清除途径 综合多项人或动物试验,分子量在 190 kDa 以内 PEG 分子,主要从肾脏排泄清除,较少部分是经胆汁从肠道清除。Yamaoka 等^[23]的试验详细论证了 PEG 分子量对肾排泄和胆汁排泄方式的影响,见图 1。

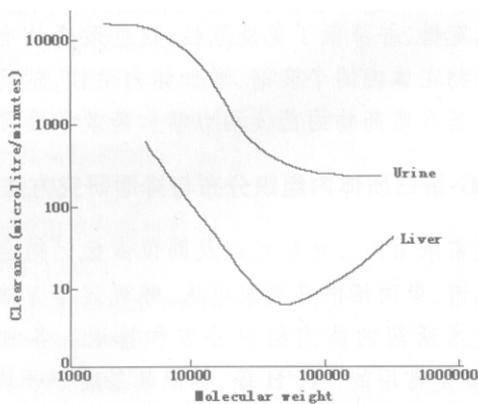


图 1 PEG 分子量与肾排泄率和肝排泄率的关系

Yamaoka 等^[23]试验得出的重要结论是:(1)随着分子量的增大,PEG 分子的肾清除率逐渐降低,当分子量大于 20 000 时,PEG 分子肾清除率明显降低,但是,肾清除仍是其主要的清除机制;(2)胆汁

的清除也与 PEG 的分子量大小有关,50 000 的 PEG 胆汁清除率最低,低于或高于 50 000,PEG 的胆汁清除率都增高,但两者的机制不同。高于 50 000 的 PEG 主要通过明显增加的肝 Kupffer 细胞吞噬作用而增加肝清除的 PEG;(3)虽然分子量大小影响肾和胆汁排泄 PEG 分子的效率,但分子量在 190 000 之内的 PEG 分子其主要的排泄途径仍然是肾脏,胆汁排泄仅占较少的部分。

3.2 PEG 的代谢 人和动物 PEG 的体内代谢形式基本一致^[27],也比较简单。主要通过乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase)将 PEG 的乙醇基(Alcohol groups)氧化成羧酸(Carboxylic acids),PEG 分子体内代谢的比率与其分子量密切相关,分子量大于 5 000 的 PEG 分子(如多数 PEG-蛋白质新药中的 PEG 分子)极少或几乎不发生体内代谢;分子量在 5~50 000 之间,随着分子量的增加,PEG 分子从肝胆汁中清除的比例逐渐降低;PEG-蛋白质分子中因 PEG 分子的主要代谢点“-OH”已被“占用”(一个被甲基化(CH₃-),另一个与蛋白氨基偶联),故极少通过酶代谢。因此,从代谢的角度分析,大分子 PEG 比小分子量(小于 5 000)安全性更高;且 PEG 的主要代谢产物为乙二酸和羧酸,其毒性很小,但在病人使用超大剂量(100 g/d) PEG 时,也会因此出现酸中毒和高钙血症^[28]。

PEG 分子量大小不但影响药物的代谢清除,而且 PEG 链的形式也影响药物的代谢清除。有研究证明直链和支链的 PEG 与干扰素(IFN)结合形成的两种 PEG-IFN 的代谢清除方式显著不同,直链 PEG-IFN 在血液中主要通过肽酶快速降解,生成的 PEG 通过肾脏由尿排泄,而在血液中主要通过肽酶缓慢降解,使这种 PEG-IFN 到达肝脏,生成的 PEG 分子从肝胆汁中清除,见图 2。对于一种抗肝炎病毒的 IFN 来说,支链的 PEG-IFN 的这一代谢降解和清除显然会优于直链的 PEG-IFN。

3.3 PEG-蛋白质药代动力学与安全性 根据 Herold 等^[29]的试验研究,局部应用含有 60% PEG300、5% PEG1000、32% PEG4000 的乳剂累计要达到血浆 PEG 浓度 30~70 mmol 时才会出现毒性;故 PEG 反复应用所致的人体亚急性毒性靶器官是肾脏,主要的毒性是急性肾小管坏死及其所引起的急性肾功能衰竭。在人或动物中,分子量在 190 000 以内的 PEG 分子,主要以原型形式从肾脏排泄清除,较少部分经胆汁从肠道清除;PEG 在体内主要通过乙醇脱氢酶将 PEG 的乙醇基氧化成羧酸代谢,

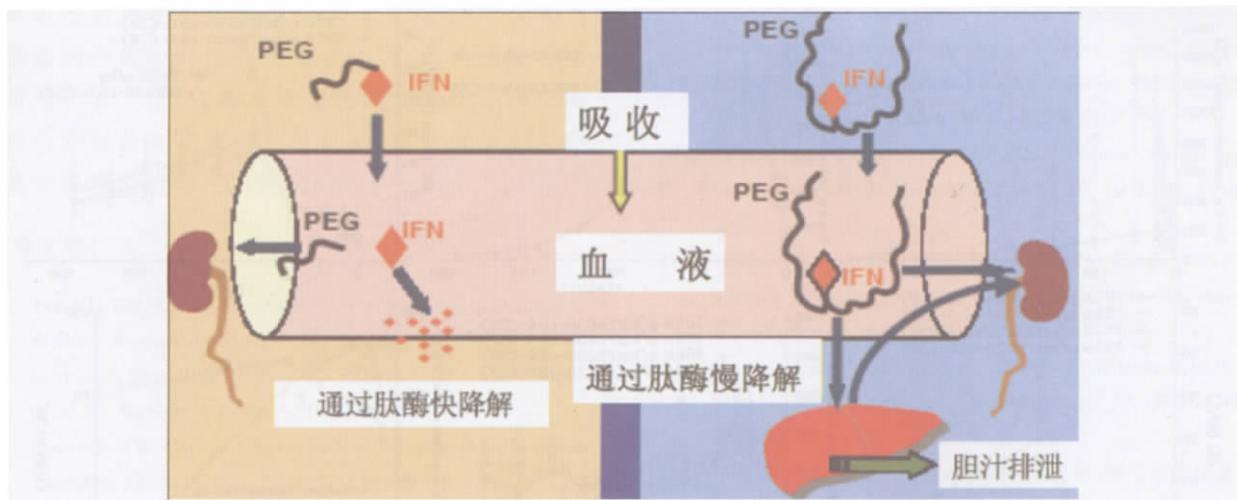


图 2 直链和支链的 PEG-IFN 的代谢清除方式的差异

且多数 PEG-蛋白质新药中的 PEG 分子极少或几乎不发生体内代谢; PEG 的毒性很低, 人体应用的安全性很高, 其治疗指数 (the therapeutic index) 在 600 倍以上。

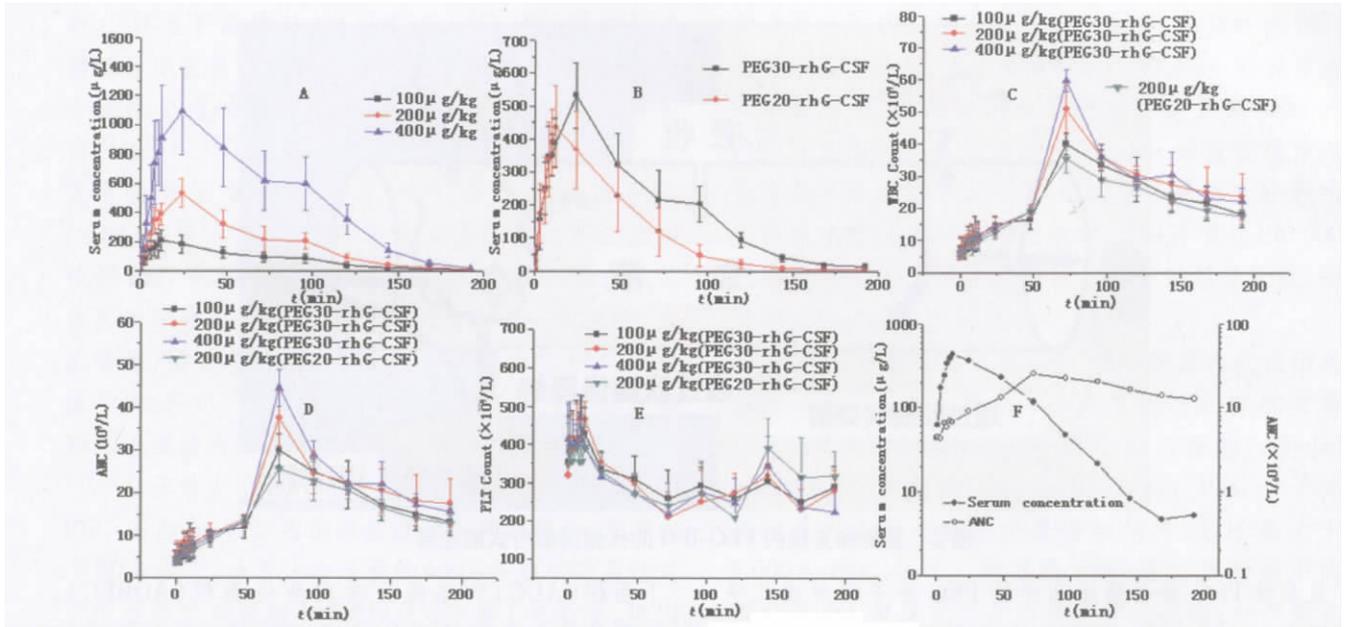
Neulasta 自 2002 年先后在美国、澳大利亚和欧洲上市以来, 目前临床应用的病人数已超过 100 万人。Neulasta 的注射剂量为 6 mg/次/化疗周期, 是临床相同指征 Filgrastim 应用剂量 (5 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 300 $\mu\text{g}/\text{次}$) 的 20 倍。但 Neulasta 主要的副反应仍是骨痛, 发生率与 Filgrastim 相当, 未见其他特殊毒副反应报道^[11]。目前给药量较大的 PEG-蛋白质类新药是聚乙二醇化可溶性肿瘤坏死因子受体 (PEG-sTNFRI) 和聚乙二醇化人生长抑素 (Somavert) PEG-sTNFRI 的分子量为 60 000, 由分子量 30 000 的 PEG-ALD 与 sTNF RI 蛋白 N 末端偶联而成, 与 Neulasta (PEG-rhG-CSF) 所使用的 PEG 种类、偶联方式与位点一致, 在给药 60 mg/次、1 次/2 周、连续 28 周的模式下, 未发现与 PEG 分子相关的毒副作用^[30, 31]。

4 研究实例

4.1 PEG30-rhG-CSF 注射剂 PEG30-rhG-CSF 是集落刺激因子 (G-CSF) 的长效制剂, 是把分子量为 30 000 的单链 PEG 共价偶联到 rhG-CSF 的 N 末端氨基上而形成的长效制剂, 其平均分子量为 49 000。它与目前国内外上市和进入临床实验的 PEG20-rhG-CSF 不同, 其 PEG 的分子量增大 (由 20 000 增加到 30 000)。PEG30-rhG-CSF 的药代动力学以及药效动力学研究的浓度-效应曲线, 见图 3。PEG 分子量的增加有望延长药物消除半衰期 ($t_{1/2\text{ke}}$)、提升中性粒细胞绝对值的 (ANC) 数量、提高药时曲线

下面积 (AUC) 和基线上效应曲线面积 (AOBEC)。经药效学和毒理学实验证实, PEG30-rhG-CSF 单次给药后升高 ANC 的效果比多次给予 rhG-CSF 作用更强, 维持时间更长, 并且耐受性良好^[32]。

本实验主要研究比格犬单次皮下注射不同剂量的 PEG30-rhG-CSF 的药代动力学以及药效动力学, 并比较相同剂量下的 PEG30-rhG-CSF 和 PEG20-rhG-CSF 的药代及药效动力学行为。采用 ELISA 法测定比格犬皮下注射 PEG-rhG-CSF 后的血药浓度, 用全自动血液分析仪测定全血的 WBC、ANC 和 PLT 计数, 实验数据用 DAS2.0 药动程序拟合分析并计算药动参数和药效参数。研究药后不同时间的药物浓度变化和 ANC 变化关系, 以获得浓度-效应-时间曲线, 揭示药动学与药效学的相关性机制。药代动力学研究结果表明: PEG30-rhG-CSF 的 3 个剂量组间平均消除半衰期为 40.6 h (33.5 ~ 45.4 h); 平均达峰时间 T_{max} 为 19.2 h (11.7 ~ 24.0 h); 3 个剂量组的药物血清清除率 (CL) 有随剂量增大而降低的趋势; 峰浓度 (C_{max}) 和药时曲线下面积 ($\text{AUC}_{0-192\text{h}}$) 均与剂量呈正相关 (药时曲线见图 3-A, B, C, D, E)。药效动力学研究结果表明, 各剂量组效应消除相半衰期 $t_{1/2\text{E}}$ 差异不大, 在 60 ~ 80 h 之间; 效应达峰时间 ANC T_{max} 均为 72 h; 最大效应浓度 ANC C_{max} 和基线上效应曲线面积 AOBEC 均有随剂量增大而上升的趋势。血液中血小板计数在给药后 8 ~ 12 h 曾一度略有升高, 24 h 以后呈下降趋势。动物皮下注射同剂量 PEG30-rhG-CSF 和 PEG20-rhG-CSF 后, 前者 $t_{1/2}$ 较后者明显延长 (约 12 h), C_{max} 和 ANCC_{max} 明显升高, AUC 和 AOBEC 明显增大 (图 3-F), 提示前者的长效作用可能优于后者。



A: Beagle 犬单次皮下注射给药 100 200 400 μg/kg PEG30-rhG-CSF 后平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$ $n = 6$)
 B: Beagle 犬单次皮下注射给药 200 μg/kg PEG30-rhG-CSF 和 PEG20-rhG-CSF 后平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$ $n = 6$)
 C: Beagle 犬单次皮下注射给药 100 200 400 μg/kg PEG30-rhG-CSF 和 200 μg/kg PEG20-rhG-CSF 后对 WBC 计数的剂量-时间依赖性影响
 D: Beagle 犬单次皮下注射给药 100 200 400 μg/kg PEG30-rhG-CSF 和 200 μg/kg PEG20-rhG-CSF 后对 ANC 计数的剂量-时间依赖性影响
 E: Beagle 犬单次皮下注射给药 100 200 400 μg/kg PEG30-rhG-CSF 和 200 μg/kg PEG20-rhG-CSF 后对 PLT 计数的剂量-时间依赖性影响
 F: Beagle 犬单次皮下注射给药 200 μg/kg PEG30-rhG-CSF 的平均血药浓度与 ANC 的关系

图 3 PEG30-rhG-CSF 的药代动力学以及药效动力学研究的浓度-效应曲线

4.2 PEG 化重组集成干扰素变体注射液猕猴药代动力学研究 PEG 化重组集成干扰素变体 (PEG-IFN- α) 注射液是通过基因重组技术生产的 PEG 化多肽类激素。该研究猕猴单次皮下注射 PEG-IFN- α (50 μg/kg) 后在动物体内的药代动力学行为,并同时与非 PEG 化蛋白重组集成干扰素变体(IFN- α) 注射液进行比较。采用放射免疫分析检测法测定猕猴分别皮下注射 PEG-IFN- α (50 μg/kg) 和 IFN- α (10 μg/kg) 后不同时间的血药浓度见图 4。猕猴分别皮下注射 PEG-IFN- α (50 μg/kg) 和 IFN- α (10 μg/kg) 后,两者药动参数比较结果显示,与非 PEG 蛋白(IFN- α) 相比,PEG-IFN- α 的平均达峰时间 T_{max} 、消除半衰期 $t_{1/2}$ 和滞留时间 MRT 分别增加了约 2.5、6 和 6 倍,清除率 CL 降低了约 100 倍, T_{max} 平均约延迟 8 h, $t_{1/2}$ 平均约延长 31 h, MRT 平均约增加 40 h。达峰时间推迟、较长的半衰期、较慢的清除率以及延长的平均滞留时间,表明经 PEG 修饰后的 IFN- α 具有更加可取的药代动力学特性。较长的半衰期和较慢的清除率明显延长药物在体内的滞留时间,从而起到长效作用。

5 结论

PEG 化蛋白质药物是目前研究的一个重要修

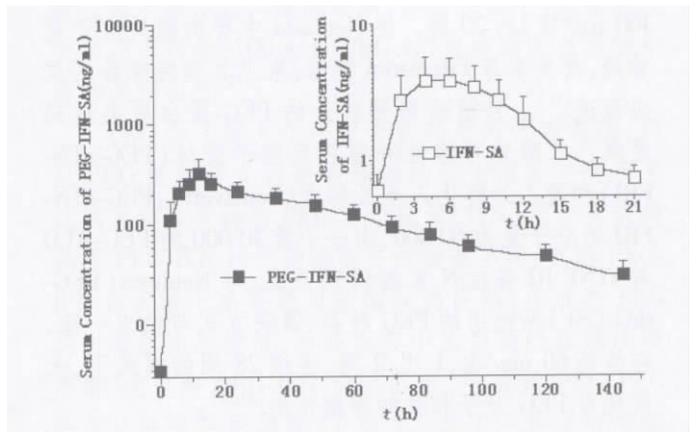


图 4 猕猴分别给药 PEG-IFN- α (50 μg/kg) 和 IFN- α (10 μg/kg) 后的平均药时曲线比较

饰方法,它可以改善可溶性和生物学利用度,增加抗蛋白水解作用,能够延长半衰期。而且经 PEG 修饰后,蛋白质药物的相对分子质量显著增加,延缓药物排泄、提高药物抵抗酶解的能力、增加稳定性、降低免疫原性,这些改变均有利于延长药物在体内的半衰期、增加体内活性,从而改善蛋白质药物的药代动力学和药效学性质。近年来,PEG-蛋白质类药物开发数量明显增加,丰富了对其临床前和临床应用安全性的知识与认识,然而其研究仍然具有挑战性,PEG 化药物安全性、有效性以及代谢机制与安全性

和有效性的关系仍然很复杂。本文从 PEG 化蛋白质药物的药代动力学和药效学性质、体内组织分布与排泄研究方法、代谢与安全性问题和研究事例揭示药动学与药效学等相关性机制,对于开展相关研究具有参考价值和应用意义。

[参考文献]

- [1] Fee CJ, Van Alstine JM. Purification of pegylated proteins [J]. *Methods Biochem Anal* 2011, 54: 339-362
- [2] Jevsevar S, Kunstelj M, Porekar VG. PEGylation of therapeutic proteins [J]. *Biotechnol J* 2010, 5(1): 113-128
- [3] Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies [J]. *Bio Drugs* 2008, 22(5): 315-329
- [4] Schmidt PG, Campbell KM, Hinds KD, et al. PEGylated bioactive molecules in biodegradable polymer microparticles [J]. *Expert Opin Biol Ther* 2007, 7(9): 1427-1436
- [5] Gaspar R, Duncan R. Polymeric carriers: preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics [J]. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61(13): 1220-1231
- [6] Spira J, Plyushch O, Zozulya N, et al. Safety, pharmacokinetics and efficacy of factor VIIa formulated with PEGylated liposomes in haemophilia A patients with inhibitors to factor VIII—an open label, exploratory, cross-over, phase I/II study [J]. *Haemophilia*, 2010, 16(6): 910-918
- [7] Webster R, Didier E, Harris P, et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies [J]. *Drug Metab Dispos* 2007, 35(1): 9-16
- [8] Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Pharmacokinetic consequences of pegylation [J]. *Drug Deliv*, 2006, 13(6): 399-409
- [9] García-García, González-Delgado CA, Valenzuela-Silva CM, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of two "pegylated" interferon alpha-2 formulations in healthy male volunteers: a randomized, crossover, double-blind study [J]. *BMC Pharmacol* 2010, 10: 15
- [10] Caliceti P. Pharmacokinetics of pegylated interferons: what is misleading [J]. *Dig Liver Dis*, 2004, 36(3): S334-S349
- [11] Webster R, Didier E, Harris P, et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies [J]. *Drug Metab Dispos* 2007, 35(1): 9-16
- [12] Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Pharmacokinetic consequences of pegylation [J]. *Drug Deliv* 2006, 13(6): 399-409
- [13] Moreno-Otero R. Therapeutic modalities in hepatitis C: challenges and development [J]. *J Viral Hepat* 2005, 12(1): 10-19
- [14] Lindh M, Uhnoo I, Bläckberg J, et al. Treatment of chronic hepatitis B infection: an update of Swedish recommendations [J]. *Scand J Infect Dis* 2008, 40(6-7): 436-450
- [15] Ferguson MC. Current therapies for chronic hepatitis C [J]. *Pharmacotherapy*, 2011, 31(1): 92-111
- [16] Fabrizi F, Lunghi G, Ganeshan SV, et al. Hepatitis C virus infection and the dialysis patient [J]. *Semin Dial*, 2007, 20(5): 416-422
- [17] Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, et al. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group [J]. *Clin Pharmacol Ther* 2000, 68: 556-567
- [18] Ferenci P. PEG IFN alfa-2a (40 KD) (Pegasys) for the treatment of patients with chronic hepatitis C [J]. *Int J Clin Pract*, 2003, 57: 610-615
- [19] Robins GW, Scott LJ, Keating GM. PEG IFN-alpha-2a (40kD): a review of its use in the management of patients with chronic hepatitis B [J]. *Drugs* 2005, 65: 809-825
- [20] Ramon J, Saez V, Baez R, et al. PEGylated interferon-alpha2b: a branched 40 K polyethylene glycol derivative [J]. *Pharm Res*, 2005, 22: 1374-1386
- [21] 刘昌孝. 聚乙二醇干扰素 α 研究的新进展: 聚乙二醇化技术 [J]. *中国临床医学* 2004, 3(3): 25-27
- [22] 吕秋军. 新药药理学研究方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007. 549
- [23] Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y, et al. Distribution and tissue uptake of Poly (ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice [J]. *J Pharm Sci*, 1994, 83: 601-606
- [24] Ren X, Wu QP, Ke S, et al. Improved radiolabeling of PEGylated protein: PEGylated annexin V for noninvasive imaging of tumor apoptosis [J]. *Cancer Biother Radiopharm* 2003, 18: 819-827
- [25] Chen X, Park R, Hou Y, et al. MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with 18F-labeled PEGylated RGD peptide [J]. *Eur J Nucl Med Imaging*, 2004, 31: 1081-1089
- [26] Shemilt GI. The Synthesis of Carbon-14 Labelled PEGs [M]. *John Wiley and Sons Ltd* 2004. London
- [27] Webster R, Didier E, Harris N, et al. PEGylated proteins: Evaluation of their safety in absence of definitive metabolism studies [J]. *Drug Metabolism and Disposition* 2007, 35(1): 9-16
- [28] Friman S, Swanvik J. Biliary excretion of 400-to-1 000-d polyethylene glycol will influence the calculation of small intestinal absorption in portacaval-shunted rats [J]. *Hepatology* 1997, 25: 500
- [29] Herold DA, Keil K, Bruns DE. Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase [J]. *Biochem Pharmacol*, 1989, 38: 73-76
- [30] Renwick W, Pettengell R, Green M. Use of filgrastim and Pegfilgrastim to support delivery of chemotherapy—Twenty years of clinical experience [J]. *Biodrugs* 2009, 23(3): 175-186
- [31] Darlington C. PEG-STNF-RI Amgen [J]. *Curr Opin Investig Drugs* 2003, 4(5): 583-587
- [32] Cai YM, Chen ZM, Jiang L, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Single Doses of Subcutaneous Pegylated Human G-CSF Mutant (PEG30-rhG-CSF) in Beagle dogs [J]. *J Clin Oncol* 2008, 5(5): 326-332
- [33] Cai YM, Zhang ZP, Fan K, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion, and antiviral activity of pegylated recombinant human consensus interferon- α variant in monkeys, rats and guinea pigs [J]. *Regul Pept* 2012, 173(1-3): 74-81

(收稿日期: 2012-01-23; 修回日期: 2012-02-05)

(本文编辑 孔爱英)