

文章编号:0253-9950(2008)01-0039-04

藤黄酸的标记及其小鼠体内分布实验

谭成¹, 俞惠新^{1, 2, *}, 林秀峰¹, 杨勇³, 张莉¹,
陈波¹, 宋翠翠², 曹国宪¹, 王正武²

1. 江苏省原子医学研究所, 无锡 214063; 2. 江南大学 化工学院, 无锡 214036;
3. 中国药科大学, 南京 210009

摘要:通过¹³¹I 标记藤黄酸以分析其在肿瘤细胞中的摄取及动物体内的分布。采用双氧水标记、氯仿萃取, 以聚酰胺薄膜为支持介质、氯仿-甲醇(体积比为 40:1)为展开剂, 测定标记率及放化纯; 分析肿瘤细胞 MCF-7 对¹³¹I-藤黄酸的摄取; KM 小鼠尾静脉注射¹³¹I-藤黄酸(每只 185 kBq), 于不同时间处死, 取各脏器, 称重、测量计数率, 计算每克组织百分注射剂量率。¹³¹I-藤黄酸标记率达 86%, 放化纯在 1, 4, 20 d 分别为 97.2%, 95.4%, 93.3%; MCF-7 在 30 min 时对¹³¹I-藤黄酸摄取率达 3.50%, 显著高于对 Na¹³¹I 的摄取($P < 0.01$); ¹³¹I-藤黄酸在体内分布广泛, 以肝、肾和肠为最多, 肝中 5 min 时放射性摄取达 25.93% ID/g, 4 h 则为 5.54% ID/g, 而肾中 5 min 时为 6.37% ID/g, 4 h 时为 2.46% ID/g; 甲状腺中的放射性摄取随时间的延长而增加。¹³¹I-藤黄酸标记物稳定; 肿瘤细胞 MCF-7 对¹³¹I-藤黄酸有显著摄取; 体内主要通过肝肾代谢。

关键词:藤黄酸; 放射性碘标记; 细胞摄取; 体内分布

中图分类号:R817 **文献标志码:**A

Radioiodinated of Gambogic Acid and Its Biodistribution in Mice

TAN Cheng¹, YU Hui-xin^{1, 2, *}, LIN Xiu-feng¹, YANG Yong³, ZHANG Li¹, CHEN Bo¹,
SONG Cui-cui², CAO Guo-xian¹, WANG Zheng-wu²

1. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China;

2. School of Chemical and Material Engineering of Southern Yantze University, Wuxi 214036, China;

3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: The preparation of radioiodinated gambogic acid and its cell uptake in MCF-7 and bio-distribution in mice were investigated. Gambogic acid was labeled with ¹³¹I using hydrogen peroxide. The radiolabeled compound was characterized by polyamide TLC, in which the substratum of V(trichloromethane):V(methanol)=40:1 was used as developing agent. The uptake of ¹³¹I-gambogic acid in cancer cells was measured. Biodistribution studies were carried out in KM mice. At different time after radiopharmaceutical i. v. administration (185 kBq ¹³¹I-gambogic acid/mouse), the animals were sacrificed. Blood samples and the tissues of interested were collected, weighted and counted. The percent injected dose per gram (%ID/g) was calculated for each sample. The labeling yield of ¹³¹I-gambogic acid is 86% and its radiochemistry

收稿日期:2006-12-31; 修订日期:2007-08-13

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2006026); 国家自然科学基金资助项目(30470496)

作者简介:谭成(1974—), 男, 江苏涟水人, 助理研究员, 细胞生物学专业

* 通讯联系人:俞惠新(1966—), 男, 江苏江阴人, 副研究员, 生物化学和核医学专业, yu_huixin@sina.com

purity are 97.2%, 95.4%, and 93.3% at 1, 4, and 20 d, respectively. The uptake of ¹³¹I-gambogic acid in MCF-7 shows markedly higher compared with Na¹³¹I($P<0.01$). The *in vivo* biodistribution in mice indicates that ¹³¹I-gambogic acid is mainly uptaked in liver, kidney, and intestines. The radioactivity in thyroid increases with time. ¹³¹I-gambogic acid is stable and is markedly uptaked in cancer cells MCF-7. In mice, it is mainly metabolized by liver and excreted through kidney.

Key words: gambogic acid; radioiodinate; cellular uptake; biodistribution

藤黄酸(gambogic acid, GA)是从藤黄中分离提取出来的一种抗癌有效成分。据文献[1-3]报道,藤黄酸对 S180、肝癌、胰腺癌等多种动物移植性肿瘤均有明显的抑制作用,且对正常的造血系统无明显影响,毒性较低,动物耐受良好。Shailaja等^[4]发现藤黄酸能够通过阻碍转铁蛋白受体的内在化来促进肿瘤细胞凋亡。但有关藤黄酸在鼠体内的药动学研究报道甚少。鉴于藤黄酸在抗肿瘤方面的作用,本工作拟通过放射性碘标记藤黄酸来探索藤黄酸在肿瘤细胞中的摄取及在体内的分布代谢,以期在此基础上进一步开展藤黄酸抗癌作用机理的研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料

藤黄酸,中国药科大学,其结构式示于图1^[5];Na¹³¹I,中国原子能科学研究院;KM 小鼠,扬州大学实验动物中心,饲养于本所动物房;人乳腺癌细胞 MCF-7 和人神经母细胞 SH-SY5Y,中国科学院上海生物细胞所细胞库;小牛血清,浙江杭州四季青公司;MEM 和 RPMI-1640,美国 Gibco 公司;聚酰胺薄膜,浙江台州市路桥四甲生化塑料厂;PACKARD-C5002 型 γ 计数仪,美国 PE 公司;其他试剂为国产分析纯。

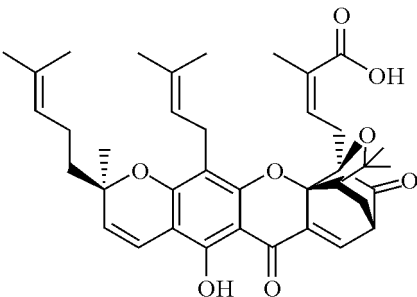


图 1 藤黄酸的结构式

Fig.1 Chemical structure of gambogic acid

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7 培养基为含 10% 小牛血清的 RPMI 1640,SH-SY5Y 为含 10% 小牛血清的 MEM,在 37℃,5% CO₂ 的培养箱中维持培养。

1.2.2 ¹³¹I-藤黄酸的制备 利用双氧水法对藤黄酸进行¹³¹I 标记^[6]。标记管中依次加入 40 μ L 藤黄酸(1g/L,乙醇为溶剂),5 μ L 4 mol/L HCl,5 μ L 18 MBq Na¹³¹I,5 μ L $\phi=5\%$ H₂O₂ 振荡反应 15 min,然后加入 5 μ L 饱和 Na₂S₂O₃ 和 5 μ L 4 mol/L 氨水终止反应。标记物以三氯甲烷萃取,吹干,乙醇溶解备用。以聚酰胺薄膜为介质,三氯甲烷-甲醇(体积比为 40:1)为展开剂,测定标记物的标记率和放化纯。

1.2.3 ¹³¹I-藤黄酸的细胞摄取 分别取对数生长的 MCF-7 和 SH-SY5Y 细胞,经消化、计数,以无血清培养基调整细胞浓度为 2.5×10^6 /mL,每毫升细胞加入 0.1 mL 172 kBq ¹³¹I-藤黄酸,混匀后置 37℃ 水浴孵育,分别于 5 min,30 min,1 h,2 h 及 4 h 取 200 μ L 细胞悬液,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,细胞沉淀用 4℃ 生理盐水洗涤 2 次,测细胞中的放射性计数率(min^{-1}),按式(1)计算细胞摄取率。空白管中不加细胞而含等量 ¹³¹I-藤黄酸。所有操作均采用 4 复管。

细胞摄取率=100%(样品管放射性计数率-空白管放射性计数率)/每管总放射性计数率。(1)

1.2.4 ¹³¹I-藤黄酸的小鼠体内分布 KM 小鼠,约 20 g,4 周龄,随机分为 5 组,每只尾静脉注射 200 μ L 185 kBq ¹³¹I-藤黄酸,分别于注射后不同时间(5,10,30,60,120,240,1 440 min)断颈处死小鼠,分别取心、肝、肺、肾、脾、肌、骨、脑、肠、血,称重、测放射性计数率,按式(2)计算每克组织百分注射剂量率(%ID/g)。

每克组织百分注射剂量率=100%各组织放射性计数/(每只总计数 $\times$ 组织质量)。(2)

1.3 统计方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 t 检验。

2 结果

2.1 ¹³¹I-藤黄酸制备及鉴定

在以聚酰胺薄膜为支持介质,以三氯甲烷-甲醇(体积比为 40:1)为展开剂的体系中,¹³¹I-藤黄酸的 R_f 为 0.9~1.0,而游离¹³¹I⁻的 R_f 为 0.0~0.1。经测定¹³¹I-藤黄酸标记率达 86%,经三氯甲烷萃取后放化纯(RCP)达 97.2%,而 4 d 和 20 d 后仍分别为 95.4%,93.3%,显示¹³¹I-藤黄酸在 3 周内保持稳定。因此标记物的放化纯及稳定性可适用于代谢及示踪等进一步研究。

2.2 ¹³¹I-藤黄酸的细胞摄取

细胞摄取¹³¹I-藤黄酸的结果列于表 1。表 1 结果表明,MCF-7 细胞对¹³¹I-藤黄酸有明显摄取,在 5 min,30 min,1 h,2 h 和 4 h 时细胞摄取率分别为 2.70%,3.50%,2.85%,1.38% 和

0.66%,显著高于对 Na¹³¹I 的摄取($P<0.01$);而人神经母细胞(SH-SY5Y)对¹³¹I-藤黄酸没有摄取,在实验期间其对¹³¹I-藤黄酸的摄取均小于 0.1%,与 Na¹³¹I 间无明显差异($P>0.05$)。

2.3 ¹³¹I-藤黄酸小鼠体内分布

¹³¹I-藤黄酸在小鼠体内的生物分布列于表 2。表 2 结果显示,静脉注射给药后藤黄酸在体内广泛分布。但主要分布于肝、肾、肠和心、肺、脾,其中以肝脏的分布最多,放射性摄取在 5 min 时达 25.93% ID/g,4 h 时仍有 5.54% ID/g;肾中 5 min 时为 6.37% ID/g,10 min 时升至 6.57% ID/g,然后缓慢下降,4 h 后为 2.46% ID/g;肠中分布也较多,5 min 时达 14.69% ID/g,4 h 则为 3.74% ID/g;而脑中分布较少,5 min 时仅为 0.30% ID/g;甲状腺内的放射性随时间的延长而逐渐增加,甲状腺与血的放射性摄取比值由静脉注射¹³¹I-藤黄酸后 5 min 时的 2.0 倍升至 240 min 时的 94.9 倍,与时间基本呈线性关系。

表 1 细胞对¹³¹I-藤黄酸的摄取率
Table 1 Uptake ratio of ¹³¹I-GA by cells

细胞(Cells)	药物(Medicines)	细胞摄取率(Uptake ratio by cells)/%				
		5 min	30 min	60 min	120 min	240 min
MCF-7	¹³¹ I-GA	2.70±0.03	3.50±0.14	2.85±0.09	1.38±0.04	0.66±0.06
	Na ¹³¹ I	0.06±0.03	0.07±0.02	0.10±0.04	0.06±0.05	0.07±0.03
SH-SY5Y	¹³¹ I-GA	0.03±0.05	0.14±0.07	0.09±0.04	0.04±0.04	0.06±0.04
	Na ¹³¹ I	0.03±0.01	0.02±0.04	0.04±0.02	0.05±0.03	0.03±0.01

表 2 ¹³¹I-藤黄酸在小鼠体内的生物分布
Table 2 Biodistribution of ¹³¹I-GA in mice

组织(Tissues)	每克组织百分注射剂量率(Percentage of the injected dose per gram of tissue mass)/(%ID · g ⁻¹)						
	5 min	10 min	30 min	60 min	120 min	240 min	1 440 min
心(Heart)	3.64±0.84	4.53±0.64	3.13±0.36	3.29±1.14	1.59±0.40	1.51±0.17	0.49±0.05
肝(Liver)	25.93±5.13	23.87±5.96	10.93±2.37	10.66±1.49	6.74±0.98	5.54±0.82	1.20±0.11
肺(Lung)	6.38±0.28	7.88±3.06	3.48±0.64	2.88±0.56	1.75±0.92	1.25±0.25	0.37±0.27
肾(Kidney)	6.37±1.13	6.57±0.64	4.30±0.54	4.24±0.34	2.43±0.28	2.46±0.58	0.58±0.11
脾(Spleen)	5.15±0.31	6.21±0.30	3.61±0.42	2.99±1.02	1.81±0.69	2.01±0.35	0.74±0.27
肌(Muscle)	1.20±0.63	1.28±0.28	0.90±0.16	0.76±0.16	0.55±0.17	0.57±0.14	0.18±0.03
骨(Bone)	1.80±0.31	2.46±0.98	1.80±0.95	1.23±0.21	1.09±0.17	1.80±1.10	0.58±0.13
脑(Brain)	0.30±0.04	0.72±0.64	0.37±0.15	0.46±0.57	0.16±0.04	0.19±0.05	0.12±0.03
肠(Intestines)	14.69±1.10	4.64±4.51	3.94±1.67	5.76±1.98	3.84±1.87	3.74±2.49	0.35±0.12
甲状腺 (Thyroid gland)	9.30±2.92	16.40±6.18	44.81±18.62	72.42±29.60	104.3±33.2	144.2±25.1	292.1±166.6
血(Blood)	4.55±1.03	4.02±0.97	2.46±0.29	2.40±0.40	1.34±0.25	1.52±0.13	0.47±0.09

注(Note): n = 5

3 讨 论

中药及中药单体的现代化研究是目前国内药物创新研究的热点和重点,放射性标记中药单体可为其机理探索提供非常简便和有效的手段^[7]。藤黄具有抗肿瘤作用的研究报道始见于 20 世纪 80 年代,后有学者进一步确定了其主要的有效成分为以藤黄酸为代表的桥环氧杂蒽酮(xanthone)化合物^[8]。并经多次实验重复证实藤黄酸为其主要的有效成分,其抗癌作用与一般的化疗抗癌药有所区别,能选择性地杀死癌细胞,而对正常的造血系统没有影响,是一种很有前景的化疗药物^[9]。目前,藤黄酸在体内的代谢过程尚不清楚,有关报道很少,而且其在体内及细胞内的作用机理也存在争议^[4, 10]。

本研究制备的¹³¹I-藤黄酸标记物稳定,标记后 20 d 其放化纯度维持在 93.3%,适于藤黄酸在体内外的微量示踪研究。利用¹³¹I-藤黄酸具有灵敏准确的放射性示踪特点,可简便地观察分析其在细胞及整体生物体内的分布及代谢过程和可能的作用靶点。

细胞摄取结果显示乳腺癌细胞 MCF-7 可摄取一定量的¹³¹I-藤黄酸,而人神经母细胞 SH-SY5Y 对¹³¹I-藤黄酸无摄取。可能是肿瘤细胞膜上表达有大量的转铁蛋白受体,而藤黄酸能和转铁蛋白受体结合^[4],从而使乳腺癌细胞 MCF-7 表现出对藤黄酸有明显摄取;而作为正常细胞的人神经母细胞 SH-SY5Y 不或低表达转铁蛋白受体,使细胞对藤黄酸无明显摄取。若此假设能得到进一步证实,则放射性标记的藤黄酸可用于转铁蛋白受体阳性肿瘤的显像及放射性治疗。

分布试验的结果显示,静脉注射给药后藤黄酸可分布于心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、脑、骨骼肌,说明藤黄酸在体内可以广泛分布,但主要分布于肝、肾、肠,提示藤黄酸主要是通过肝脏代谢、肾排泄。郝琨等^[11]认为藤黄酸在肠中分布是比较少的,但其对 40 min 后的代谢情况未作进一步研究,本实验则表明即使在 4 h 的时候肠中分布依然达到 3.74%ID/g,我们认为一方面是由于藤黄

酸标上碘后理化性质发生改变,另一方面可能揭示¹³¹I-藤黄酸有靶向肠组织的特性,当然也可能和实验动物的品系有关^[11]。实验也显示甲状腺内的放射性随时间的延长而逐渐增加。

对于藤黄酸体内及胞内的抗癌作用机理以及在肠组织中的高分布情况需要在以后的实验中进一步探讨。

参考文献:

- [1] 孔令东,叶定江,吴 皓,等. 藤黄的炮制及其现代研究概况[J]. 中国中药杂志,1995, 20 (2): 89-91.
- [2] 刘静冰,秦叔逵,李 进,等. 藤黄酸抗胰腺癌作用的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志,2005, 10 (3): 274-277.
- [3] 郭青龙,赵 丽,吴照球,等. 藤黄酸对实验性动物造血功能及免疫功能的影响[J]. 中国天然药物, 2003, 1(4): 229-232.
- [4] Shailaja K, Katayoun A J, Sergei M, et al. A Role for Transferrin Receptor in Triggering Apoptosis When Targeted With Gambogic Acid[J]. PNAS, 2005, 102(34): 12 095-12 100.
- [5] Zhang Han-zhong, Shailaja K, Wang Yan, et al. Discovery, Characterization and SAR of Gambogic Acid as a Potent Apoptosis Inducer by a HTS Assay [J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12: 309-317.
- [6] 陆春雄,吴春英,蒋泉福. β -淀粉样蛋白斑块显像剂¹³¹I-IMPY 的合成与生物分布[J]. 核化学与放射化学,2005, 27(4): 232-235.
- [7] 林秀峰,俞惠新,谭 成,等. 红景天苷的碘标记及其在小鼠体内的分布[J]. 核技术,2006, 29(12): 913-916.
- [8] 雷秋模,刘金妹,龚德恩,等. 藤黄抗癌的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志,1985, 7(4): 282.
- [9] 雷秋模,刘金妹. 藤黄抗癌作用研究的回顾与展望[J]. 肿瘤防治杂志,2003, 10(2): 216-219.
- [10] Gu H Y, Guo Q L, You Q D, et al. Gambogic Acid Induced Apoptosis in Human Hepatoma SMMC-7721 Cells With p53 and Bax Up-Regulated [J]. Chin J Nat Med, 2005, 3(3): 169-172.
- [11] 郝 琨,柳晓泉,王广基,等. 藤黄酸在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国药科大学学报,2005, 36(4): 338-341.