

• 药理与临床 •

五加皮 Age 蛋白在正常小鼠与荷瘤小鼠体内的组织分布

赵学涛, 单保恩*, 张 静

(河北医科大学第四医院 科研中心暨河北省肿瘤基因诊断、预防和治疗重点实验室, 河北 石家庄 050011)

摘 要:目的 探讨五加皮抗肿瘤成分 Age 蛋白在正常小鼠与荷瘤小鼠体内的组织分布。方法 用氯胺 T 法对 Age 蛋白进行 ^{125}I 标记 (形成 ^{125}I -Age), 由尾 iv 小鼠后, 于不同时间取组织和血液标本, 测定放射 cpm 比值。以放射参与量 (即脏器与血液中 cpm 比值) 作为 ^{125}I -Age 在组织中分布的依据。结果 在一次性快速 iv ^{125}I -Age 2 h 后, 正常小鼠和荷瘤小鼠体内均以肾脏中 ^{125}I -Age 的分布量最高, 肝脏和肺部放射参与量也较高, 与心脏、脾脏等其他脏器相比差异有显著性 ($P < 0.01$); 尿中 ^{125}I -Age 的量很高。iv 同等剂量 ^{125}I -Age 后, 荷瘤小鼠的肾脏、肝脏和肺部组织的放射参与量比正常小鼠偏高 ($P < 0.05$)。结论 五加皮 Age 蛋白在小鼠体内主要分布于血流丰富的组织, 主要通过泌尿系统排泄, 不易透过血脑屏障。

关键词:五加皮; ^{125}I 标记; Age 蛋白; 组织分布

中图分类号:R285.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)07-1038-04

In vivo tissue distribution of Age protein from *Cortex Acanthopanax*
in normal and tumor-bearing mice

ZHAO Xue-tao, SHAN Bao-en, ZHANG Jing

(Research Center and Key Laboratory of Tumor Gene Diagnosis, Prophylaxis and Treatment in Hebei Province,
The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To determine the *in vivo* tissue distribution of Age protein, an antitumor component isolated from *Cortex Acanthopanax* in normal and tumor-bearing mice. **Methods** Age protein isolated from *Cortex Acanthopanax* was labelled with ^{125}I (^{125}I -Age) by chloramine-T method. The distribution of ^{125}I -Age in various organs was judged by the cpm ratio of their relative mixture of radioactivity compared to that of blood. **Results** Two hours after rapid iv injection of ^{125}I -Age in mice tail once, the highest concentration of ^{125}I -Age was in kidney, followed successively in liver and lung which were higher than that in heart, liver, and other organs as well, showing significant difference statistically ($P < 0.01$). The concentration of ^{125}I -Age in the urine was rather high. In tumor-bearing mice by iv the same dose, the concentration of ^{125}I -Age in kidney, liver, and lung was higher than that in normal mice ($P < 0.05$). **Conclusion** The basic characters of tissue distribution of Age protein in mice: the concentration of Age protein is higher in the tissue with abundant blood stream. The Age protein is excreted mainly by urinary system, and hard to permeate through blood-cerebral barrier.

Key words: *Cortex Acanthopanax*; ^{125}I labelled; Age protein; tissue distribution

本课题组在对 500 种中药筛选抗肿瘤成分过程中, 发现五加皮提取物具有较强的抗肿瘤活性^[1], 并从五加皮提取物中分离得到相对分子质量约 6.4×10^4 的单一抗肿瘤成分——Age 蛋白。研究证实, Age 蛋白对多种组织来源的肿瘤细胞增殖有较强的抑制作用, 可促进单核细胞的吞噬功能, 刺激单核细胞因子的分泌, 如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

等。经 Age 蛋白作用后, 肿瘤细胞周期停止在 G_0/G_1 期, Age 蛋白可诱导瘤细胞 Rb、Cak₂ 和 Cak₄ 表达降低, 使细胞停止增殖, 即 Age 蛋白通过调节控制细胞周期的酶类、刺激单核细胞因子的分泌及吞噬功能的增强而发挥抗肿瘤作用。细胞因子还可通过调节细胞免疫功能达到治疗肿瘤作用^[2]。荷瘤小鼠 ig Age 蛋白后, 实验组小鼠一般情况较对照组小鼠

收稿日期: 2005-11-02

基金项目: 国家自然科学基金 (3037153); 河北省自然科学基金 (C2004000610)

作者简介: 赵学涛 (1977—), 男, 河北省阜城县人, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤免疫及抗肿瘤药物开发。

Tel: (0311) 86033941-290 E-mail: ZXT7701@yahoo.com.cn

* 通讯作者 单保恩 Tel: (0311) 86033941-283 Fax: (0311) 86992004 E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

好,肿瘤生长较慢,生存期明显延长^[3]。然而, Age 蛋白在体内的代谢过程、对不同组织器官的亲合力及其排泄途径尚不清楚。本实验用 ^{125}I 标记 Age 蛋白,对其在正常小鼠和荷瘤小鼠体内的组织分布进行了研究,为 Age 蛋白的进一步开发及临床应用提供资料。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂: Age 蛋白由本实验室分离纯化,质量分数 $>98\%$; $\text{Na } ^{125}\text{I}$ 购自北京原子高科核技术应用股份有限公司; Sephadex G50 为华美生物技术公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料公司, RPMI-1640 培养基和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, 氯胺 T 和偏重硫酸钠等为国产分析纯试剂。

1.2 实验动物细胞株: 健康昆明种小鼠, 体重 (20 ± 2) g, 雄性, 由河北医科大学实验动物中心提供。S₁₈₀ 小鼠腹水癌细胞株由本室存留。用 RPMI-1640 培养基(含 10% 小牛血清、青霉素和链霉素各 100 U/mL), 置于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养。

1.3 实验方法

1.3.1 Age 蛋白的 ^{125}I 标记和纯化: 根据氯胺 T 法^[4,5], 向 400 μL Age 蛋白 (1.0 g/mL) 中加入 40 μL $\text{Na } ^{125}\text{I}$ (7.4×10^7 Bq) 和 40 μL 氯胺 T (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 混匀 10~5 s; 加入 40 μL 偏重硫酸钠 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 终止反应。然后加入 0.5 mL PBS (0.05 mol/L, pH7.4, 含 BAS 1 mg)。Sephadex G50 粉末用 0.05 mol/L PBS (pH7.4) 浸泡过夜, 待颗粒膨胀后制备色谱柱 (2 cm $\times$ 10 cm), 用 BSA 饱和过夜。将混合物 ^{125}I -Age 加于柱上, 用 PBS 洗脱。调整体积流量 0.5 mL/min, 用收集器 (上海市卢西厂生产, BS-100A 型) 收集, 每管收集 0.5 mL 洗脱液, 用 γ -计数器 (北京核仪器厂, FT646A3 型) 测定每管 cpm 值, 合并峰值组分, 4 ℃ 保存。

1.3.2 纸色谱法测量放化纯度: 色谱固定相用新华 1 号滤纸, 展开剂为无水甲醇与 KI (1%) 以 4:1 比例混合。在色谱纸距底边 2 cm 处用铅笔轻轻划一条与底边平行的起跑线。待测样品用微量加样器点在起跑线上, 样品间距离 2 cm, 样品半径小于 0.5 cm。为便于鉴定, 在待测样品旁点参考样。展开液浸到起跑线以下 1 cm。当展开液在纸上展开到一定程度 (15 cm 左右) 时取出, 标上前沿记号, 晾干待测。计算 R_f 值。将纸由下到上逐段剪开 (每段 1.0 cm), 用 γ -计数器分别测定每管 cpm 比值。

1.3.3 Age 蛋白在正常小鼠体内的组织分布: 将动物分为实验组和对照组, 实验组尾 iv ^{125}I -Age (148 M Bq/20 g)。分别于注射后 2、4 h 采用颈椎脱臼法

处死小鼠, 断头取血后, 分别取脑、肺、肝、脾、肾、小肠、肌肉和脂肪组织各 100 mg 置于试管中, 用 γ -计数器测量不同标本放射线量, 计算出标本的 cpm 值。用脏器与血液的 cpm 值之比 (放射参与量) 来表示 ^{125}I -Age 各脏器的分布情况^[6,7]。如果比值大于 1, 说明药物对该脏器呈高结合性。对照组在相同条件下由尾 iv 同等数量 ^{125}I 和未标记的 Age 蛋白混合液, 其余处理方法同实验组。根据实验组放射参与量 (A) 与对照组放射参与量 (B) 的比值, 作为判定 Age 蛋白在小鼠体内分布的依据。另取小鼠分为实验组和对照组, 两组的给药方法同上, 于注射后 2、4 h 分别收集尿液和粪便后, 断颈处死小鼠留取胆汁。方法同上计算出尿液、粪便及胆汁中的放射参与量。

1.3.4 Age 蛋白在荷瘤小鼠体内的组织分布: 荷瘤小鼠模型的建立, 取对数生长期 S₁₈₀ 细胞配制成 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 悬液, 于小鼠右腋 sc 细胞悬液, 每只 0.2 mL。于接种后第 6 日, 可见小鼠皮下有实体瘤出现。取荷瘤小鼠, 分为实验组和对照组。其他操作同 1.3.3 项方法。

1.4 统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据间用 t 检验, 应用 SPSS 11.0 统计软件计算。

2 结果

2.1 ^{125}I -Age 标记物的纯化: 将 ^{125}I -Age 用 Sephadex G50 凝胶色谱柱分离, 分离成分 cpm 的洗脱曲线如图 1 所示, ^{125}I -Age 相对分子质量较大, 先被洗脱下来形成第一峰; ^{125}I 相对分子质量较小, 洗脱速度较慢被洗脱为第 2 峰, 两峰分离良好。

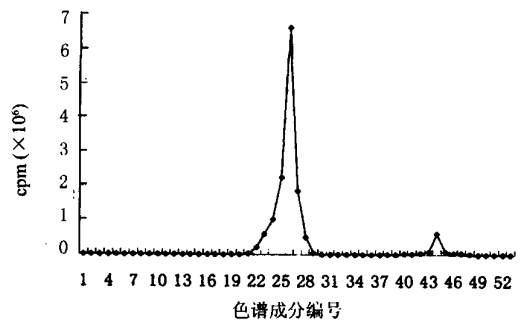


图 1 ^{125}I -Age 的 Sephadex G50 凝胶色谱洗脱成分曲线图

Fig. 1 Elution curve of ^{125}I -Age by Sephadex G50 gel column chromatography

2.2 ^{125}I -Age 放化纯的测定: 纸色谱法测得 R_f = 0.75。放化纯 = 纸色谱中标记蛋白峰总 cpm 值/纸色谱中各段 cpm 值之和; 纸色谱后各段 (每 1 cm 一段) 计数结果显示, cpm 比值峰的位置在 4.0 cm 处, 放化纯为 96.23%。

2.3 ^{125}I -Age 在正常小鼠体内的组织分布:正常小鼠一次性 iv ^{125}I -Age 后,2 和 4 h 放射参与量大于 1 的器官有肺、肝脏和肾脏,其中肾脏为最高,与其他脏器相比,如脑、心、脾、脂肪、肠、睾丸等(组织放射参与量小于 1),差异显著 ($P<0.01$)。见表 1。

2.4 ^{125}I -Age 在荷瘤小鼠体内的组织分布: ^{125}I -

Age 在荷瘤小鼠体内的分布情况与正常小鼠基本相似,2 和 4 h 放射参与量大于 1 的器官有肺、肝脏和肾脏,以肾脏为最高,与其他脏器相比,如脑、心、脾、脂肪、肠、睾丸等(组织放射参与量小于 1),差异显著 ($P<0.01$)。见表 2。

2.5 ^{125}I -Age 在正常和荷瘤小鼠体内分布的比较:

表 1 ^{125}I -Age 在正常小鼠体内组织分布 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 *In vivo* tissue distribution of ^{125}I -Age in normal mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

器 官	给药 2 h cpm			给药 4 h cpm		
	A	B	A/B	A	B	A/B
脑	0.13±0.02	0.23±0.01	0.583	0.22±0.01	0.27±0.03	0.81
肺	0.79±0.14	0.67±0.10	1.170*	2.01±0.12	1.58±0.07	1.27*
心脏	0.64±0.19	1.04±0.10	0.615	0.75±0.11	0.92±0.05	0.82
肝脏	0.90±0.11	0.55±0.13	1.388**	2.97±0.12	1.50±0.19	1.98*
脾脏	0.47±0.06	0.88±0.10	0.531	0.98±0.07	1.18±0.05	0.83
肾脏	1.13±0.11	0.73±0.10	1.550**	3.86±0.11	1.30±0.16	2.97**
肠	0.42±0.12	0.69±0.08	0.610	0.65±0.05	0.74±0.07	0.88
脂肪	0.20±0.01	0.30±0.03	0.645	0.28±0.07	0.32±0.02	0.88
肌肉	0.27±0.11	0.35±0.02	0.773	0.33±0.03	0.36±0.10	0.92
睾丸	0.33±0.16	0.68±0.05	0.477	0.75±0.08	0.83±0.03	0.90

与 A/B<1 的器官比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs organs with A/B<1

表 2 ^{125}I -Age 在荷瘤小鼠体内组织分布 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 *In vivo* tissue distribution of ^{125}I -Age in tumor-bearing mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

器 官	给药 2 h cpm			给药 4 h cpm		
	A	B	A/B	A	B	A/B
脑	0.155±0.03	0.227±0.03	0.68	0.25±0.04	0.23±0.07	1.09
肺	1.303±0.21	0.693±0.12	1.88**	2.38±0.09	1.23±0.27	1.93**
心脏	0.588±0.16	1.009±0.12	0.58	0.82±0.07	0.97±0.08	0.85
肝脏	1.317±0.14	0.634±0.14	2.08**	3.28±0.29	1.56±0.18	2.10**
脾脏	0.549±0.10	0.914±0.07	0.60	1.11±0.10	1.20±0.21	0.93
肾脏	1.366±0.33	0.772±0.06	1.77	4.89±0.11	1.25±0.17	3.91**
肠	0.442±0.08	0.624±0.11	0.70	0.69±0.12	0.77±0.09	0.90
脂肪	0.213±0.04	0.356±0.07	0.59	0.31±0.03	0.34±0.05	0.91
肌肉	0.281±0.08	0.407±0.14	0.69	0.36±0.06	0.38±0.05	0.85
睾丸	0.318±0.07	0.678±0.16	0.47	0.78±0.04	0.88±0.09	0.89

与除肺、肝脏和肾脏外的器官比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs other organs except for lung, liver, and kidney

图 2、3 结果显示,iv ^{125}I -Age 后,荷瘤小鼠肺、肝脏、肾脏的 2、4 h 放射参与量比值均比正常小鼠高 ($P<0.05$)。

2.6 ^{125}I -Age 在正常小鼠体内的代谢:表 3 结果显示,小鼠尿液中的 ^{125}I -Age 放射参与量最高,而胆汁和粪便中量甚微,提示该药物可能通过肾脏排泄,很少从肝脏和肠道排泄。

3 讨论

五加皮不仅在体外对多种肿瘤细胞增殖有抑制作用,在体内也有较好的抗肿瘤效果。其抗肿瘤活性成分是一种 Age 蛋白质成分。本实验将 Age 标记 ^{125}I 后注射给正常小鼠和荷瘤小鼠,经过测定组织

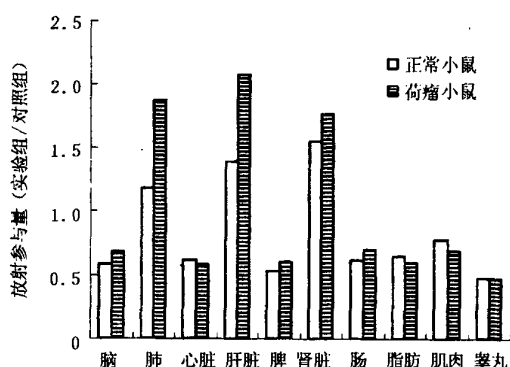


图 2 正常小鼠与荷瘤小鼠 iv ^{125}I -Age 2 h 组织分布比较
Fig. 2 Comparison of tissue distribution in normal and tumor-bearing mice after 2 h by iv ^{125}I -Age

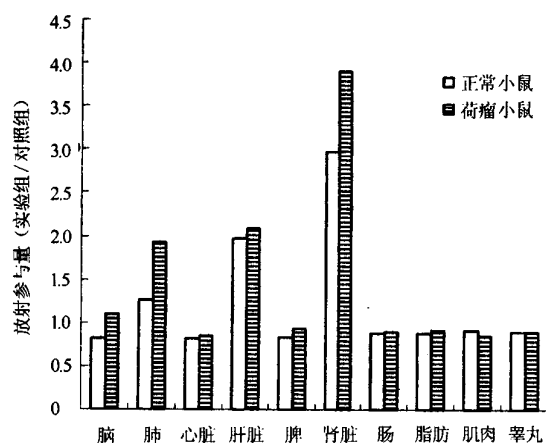


图 3 正常小鼠与荷瘤小鼠 iv ^{125}I -Age 4 h 组织分布比较

Fig. 3 Comparison of tissue distribution in normal and tumor-bearing mice after 4 h by iv ^{125}I -Age

表 3 ^{125}I -Age 在正常小鼠体内排泄 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 In vivo excretion of ^{125}I -Age in normal mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

排泄物	给药 2 h cpm			给药 4 h cpm		
	A	B	A/B	A	B	A/B
粪便	0.34 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.61	0.39 ± 0.06	0.78 ± 0.18	0.5
尿液	27.53 ± 2.19	8.98 ± 1.03	3.07^{**}	49.08 ± 1.28	10.02 ± 0.39	4.9^{**}
胆汁	0.58 ± 0.12	0.75 ± 0.09	0.77	0.78 ± 0.13	0.91 ± 0.08	0.8

与粪便或胆汁比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs dejecta or bile

References:

- [1] Shan B N, Li Q X, Liang W J. Experimental study on anti-tumor effect of *Cortex Acanthopanax Senticosu E* in vivo and in vitro [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2004, 24(1): 55-58.
- [2] Shan B N, Si C Y, Zhang J Z. The isolation of anti-tumor component of *Acanthopanax gracilistylus* [J]. *Carcinog Teratog Mutag* (癌变·畸变·突变), 2004, 16(4): 203-207.
- [3] Shan B N, Duan J P, Zhang L H. Stimulating activity of *Acanthopanax gracilistylus* anti-tumor component on monocytes [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2003, 19: 490-493.
- [4] Ye W X, Chen Q, Xiao Y L. *Laboratory Nuclear Medical*

Technology (实验室核医学技术) [M]. Changchun: Jilin Science and Technology Publishing House, 1991.

- [5] Zhu L X, Wang Q C, Lin G F. The study of pharmacokinetics of a pure fraction from snake venom with thrombin-like enzyme activity in rabbits [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1990, 4: 213-219.
- [6] Gunoa K A, Osman O H, Kertesz G. Distribution of ^{125}I -labelled *Biris arietaus* venom in rat [J]. *Toxicon*, 1974, 12: 565.
- [7] Hou L Q, Zhao L N, Lin Z T, et al. Studies on distribution and pharmacokinetics of fraction I isolated from *Naja naja* venom in model animals [J]. *Chin J Med Biol Tech Appl* (中国医学生物技术应用杂志), 2003, 4: 49-52.

补阳还五汤及其有效部位对大鼠脑缺血再灌注后 caspase 表达的影响

张淑萍, 梁 燕, 邓常青*

(湖南中医药大学 中西医结合学院, 湖南 长沙 410007)

摘要:目的 研究补阳还五汤及其有效部位生物碱、苷对大鼠脑缺血再灌注后脑组织 caspase-1、3、8 表达的影响。方法 采用颈内动脉线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)再灌注模型, 以逆转录-聚合酶链反应(RT-

收稿日期: 2005-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(30171132); 教育部高等学校学术与技术带头人资助计划项目; 湖南省优秀博士论文作者科研项目

作者简介: 张淑萍(1980—), 女, 山东烟台人, 医学硕士, 从事中西医结合心脑血管病防治机制与方剂配伍的物质基础和原理研究。

E-mail: zsp1980sd@126.com

* 通讯作者 邓常青 E-mail: dchangq@sohu.com