

大鼠硬膜外和静脉注射虎纹毒素-I 后的组织分布

廖智², 戴舒佳¹, 刘秀文^{1*}, 梁宋平², 汤仲明¹

(1. 北京放射医学研究所, 北京 100850; 2. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南长沙 410081)

摘要: 目的 比较大鼠硬膜外(ed)和 iv [¹²⁵I]标记虎纹毒素-I ([¹²⁵I]HWTX-I)后分布的差异。方法 Iodogen法制备[¹²⁵I]HWTX-I, 膈神经-膈肌法测定生物活性。反相高效液相色谱法鉴定放射化学纯度, 三氯醋酸沉淀法测定放射性药物浓度。结果 [¹²⁵I]HWTX-I 生物活性标记前后相近, 放射化学纯度为 98.5%。给药后 2 h, ed 组椎管局部放射性明显高于 iv 组 ($P < 0.05$), ed 和 iv 后组织放射性分别在 2 h 和 10 min 达峰值。泌尿系统放射性含量最高, 脂肪、肌肉和脑放射性最低。放射性主要经尿排泄。**结论** ed 后椎管局部放射性高, 维持时间较长, 血清峰浓度较 iv 组低, 有利于发挥局部镇痛作用, 减少全身副作用。

关键词: 虎纹毒素-I; 硬膜外注射; 组织分布

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)02-0146-05

虎纹毒素-I(huwentoxin-I, HWTX-I)是虎纹捕鸟蛛毒素-I(huwentoxin-I, HWTX-I)的主要成分, 由 33 个氨基酸组成, 分子量为 3.75 ku^[1]。HWAP-I是 N-型钙离子通道阻断剂^[2], 分子中所含 3 对二硫键的配对方式造成分子空间结构和生物学作用与新型多肽镇痛药芋螺毒素(ω -conotoxin, MVIA)相似^[3], 硬膜外(ed)给药显示良好的镇痛效果, 且没有成瘾性。与 MVIA 相比, 没有肌肉震颤副作用。目前, 有关多肽类镇痛药物采用较特殊的 ed 注射给药途径的药代动力学和组织分布研究未见报道。本文着重研究和比较大鼠 ed 和 iv [¹²⁵I]HWTX-I 后的组织分布特征及差异, 为其过

渡临床研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

虎纹毒素-I: 纯度 > 99.5%, 批号 010620, 湖南师范大学生命科学院提供; Na¹²⁵I 放射化学纯度 99.95%, 比活度 644 TBq·g⁻¹, PE 公司产品, 批号 NEZ033R。

1.2 动物

Wistar 大鼠, 由军事医学科学院动物中心提供, 体重(294 ± 56)g, ♀ ♂ 各半, 随机分组。全部进行硬膜外预留 PE-10 聚乙烯管, 手术后单笼饲养, 恢复 7 d 后用于实验。

昆明种小鼠, 由军事医学科学院动物中心提供, 体重 18 ~ 22 g, ♀ ♂ 各半。

1.3 [¹²⁵I]放射性标记、纯化和放射化学纯度鉴定

用 Iodogen 法^[4]制备 [¹²⁵I]HWTX-I, Sephadex G-10 凝胶柱分离纯化。层析条件: 柱体 1 cm × 50 cm, 洗脱液 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(含 0.4 mol·L⁻¹ NaCl), pH 7.0, 流速 0.5 mL·min⁻¹。分部收集洗脱液, 用 FT630G(4)放射计数器(北京核仪器厂)测定 γ 放射性。二金鸡钠酸蛋白测定试剂盒(Sigma)测定蛋白含量; 放射化学纯度用反相高效液相色谱(reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)法测定, 层析条件: HP1100 四元梯度泵, 525TR 流式闪烁计数器(Packard), Spherisorb C₁₈ 柱(300Å, 5 μ m, 4.6 mm × 200 mm, 大连化学物理所填充)。A 和 B 液分别为含 0.1% 三氟乙酸(trifluoroacetamide, TFA)的超纯水和色谱纯乙腈, 线性梯度洗脱, 30 min 内乙腈浓度为 0% ~ 100%。用小鼠膈神经-膈肌法^[5]分别测定标记前后 HWTX-I 的生物活性。

1.4 给药方法和剂量

ed 给药参照文献方法^[6], 大鼠 ip 2% 戊巴比妥钠 40 μ g·g⁻¹, 预留 PE-10 聚乙烯管于大鼠胸椎段硬

收稿日期: 2002-06-05 接受日期: 2002-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39930180)

作者简介: 廖智(1973-), 男, 湖南省长沙市人, 实验师, 硕士研究生, 主要研究方向为蛋白质分子结构与功能。

* 联系作者 E-mail: liuxw@nic.bmi.ac.cn

Tel: (010)66930304

膜外腔,通过淋巴穿刺针向硬膜外腔给药,另设尾静脉注射对照组,两组剂量均为 $13.2 \text{ kBq} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.5 样品采集、处理及放射性测定

大鼠 ed 和 iv $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ 后 10 min, 2, 8 和 48 h 各杀 5 只动物,取血、尿、心、肺、脾、眼球、股骨骨髓、肠系膜淋巴结、胸腺、骨骼肌、脑、脂肪、生殖腺、肾上腺、颌下腺、胰腺、甲状腺、肝、小肠、小肠内容物、结肠内粪、肾、膀胱等体液和组织。除上述时间点外,另在给药后 1, 5, 30 min 及 1 和 4 h 分别采血 0.2 mL, $1000 \times g$ 离心 10 min, 用微量进样器定量。组织放在塑料小杯内用感量 0.1 mg 的分析天平称湿重,制成匀浆,血清和组织匀浆均加入等体积 20% 的三氯醋酸 (trichloro-acetate, TCA) 沉淀蛋白,测定组织总放射性;离心后去上清,用 10% TCA 洗涤 1 次,测定酸可沉淀部分 γ 放射性。血清样品用 RP-HPLC 分析原型药物及代谢物的变化,色谱条件同前。

分离 T3, T6, T9, T12 和 L3 等脊椎样品,将每节脊椎分为 3 部分,即椎管外肌肉、椎骨(含硬膜外腔,vertebra + dura mater, VD)和脊髓(vertebra core, VC)。分别测定 γ 放射性。

组织药物浓度以 $\text{Bq} \cdot \text{g}^{-1}$ 组织湿重表示,血清及尿液以 $\text{Bq} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示。骨髓为 1 根股骨的骨髓,甲状腺和脊椎样品的药物浓度以占总给药量的百分数表示。

1.6 统计学处理

用组间 Student *t* 检验两种给药方式下不同样品组织中药物放射性浓度的差别。

2 结果

2.1 $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ 的放射化学纯度及生物活性

$[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ 的放射化学纯度为 98.5% (图 1-A), 标记前后对小鼠膈神经-膈肌的阻断保留时间分别为 (9.1 ± 0.4) 和 (14.1 ± 2.2) min ($P > 0.05$), 标记后仍保持生物活性。比活度为 $176 \text{ MBq} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 三氯醋酸沉淀法测定组织 $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ 的方法学确证

HWTX-I 是分子量为 3.35 ku 的小肽,在 10% TCA 中主要在上清部分,但加至组织中则主要在沉淀部分,为 71.7% ~ 88.3%, TCA 上清和沉淀分别代表 $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ 的游离型和蛋白结合型,将不同浓度的 $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ 在体外加至大鼠不同组织中,在

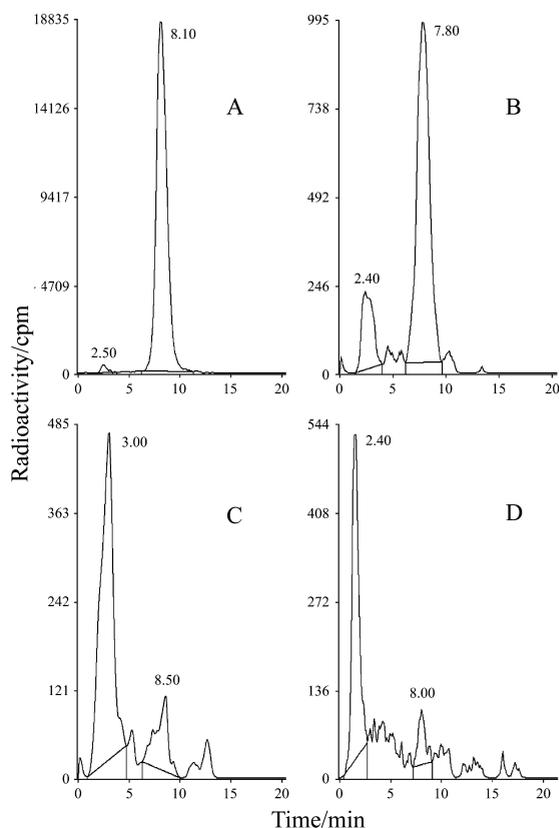


Fig 1. Representative chromatogram of $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ in rat serum. A: serum spiked with $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ *in vitro*; B: serum sample collected at 30 min after $13.2 \text{ kBq} \cdot \text{g}^{-1}$ iv administration; C: serum sample collected at 4 h after $13.2 \text{ kBq} \cdot \text{g}^{-1}$ iv administration; D: serum sample collected at 4 h after $13.2 \text{ kBq} \cdot \text{g}^{-1}$ ed administration.

1.2 ~ 2381 Bq 范围内加入药物量与组织 TCA 沉淀放射性间线性相关系数均大于 0.990。

2.3 脊椎局部药物分布

ed 后 10 min, VD 部分放射性占注入总放射性的百分数 ($2\% \pm 8\%$) 比 VC 部分 ($0.4\% \pm 0.5\%$) 高 56 倍 ($P < 0.01$), 表明药物成功地注入硬膜外腔, 而进入脊髓的 $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ 量极少。图 2 反映了 ed 后 10 min, 2 和 8 h 及 iv 2 h 后 VD 和 VC 放射性的变化, 由图可见, 注射后 2 h iv 组 VD 和 VC 放射性百分数比 ed 注射组分别为 1/7.9 和 1/13.9。

2.4 大鼠硬膜外和静脉注射 $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ 后的组织分布

表 1 结果是大鼠 ed 和 iv $[^{125}\text{I}]\text{HWTX-I}$ $13.2 \text{ kBq} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后不同时间各组织 TCA 可溶放射性和沉淀放射性随时间的变化。由表 1 结果可见, 10

Tab 1. Distribution of radioactivity in TCA soluble fraction and in TCA precipitated fraction, respectively after epidural (ed) and iv administration 13.2 kBq·g⁻¹ of [¹²⁵I]HWTX-I in rats

Tissue or body fluid	Radioactivity/kBq·g ⁻¹ tissue or MBq·L ⁻¹ body fluid											
	10 min				2 h				8 h			
	TCA soluble fraction		TCA precipitated fraction		TCA soluble fraction		TCA precipitated fraction		TCA soluble fraction		TCA precipitated fraction	
	iv	ed	iv	ed	iv	ed	iv	ed	iv	ed	iv	ed
Serum	6.9±1.5	4.2±1.0	28±6	27±8	7±3	23±30	5.4±1.2	10±4	6.8±2.7	4.5±1.7	1.7±0.6	1.6±0.4
Brain	0.3±0.1	0.2±0.1	0.7±0.2	0.8±0.3	2.0±0.8	0.7±0.2*	1.3±0.5	0.6±0.5	2.1±1.0	0.2±0.1**	1.6±0.7	0.2±0.1**
Fat	0.7±0.3	0.2±0.1*	1.3±0.4	0.4±0.2**	2.2±1.0	0.5±0.3*	1.7±0.6	0.5±0.2	1.8±0.3	0.3±0.2**	1.1±0.4	0.11±0.04**
Muscles	1.2±0.3	0.5±0.2**	5.2±1.2	2.1±0.6**	9±4	1.7±0.7**	8±3	2.3±0.5	7.3±3.0	1.0±0.4**	6±4	0.5±0.2*
Ovaries [△]	3.0±2.8	1.6±0.5	8±5	3.40±0.03	25±8	6.7±1.0	17±6	5.0±1.6	12±8	2.8±0.1	10.1±2.7	1.1±0.2*
Testes ^{△△}	1.5±1.9	0.2±0.1	8±10	0.4±0.2	4.4±1.2	1.5±0.4*	3.2±1.1	3.0±1.4	6±4	0.8±0.3	3±3	0.8±0.5
Suprarenal gland	4.3±0.8	1.8±0.5**	9±4	3.9±0.9*	12±7	4.6±2.0	11±5	3.8±1.6	8±4	1.4±0.4*	12.4±2.7	1.0±0.1**
Lymph nodes	1.4±0.5	0.5±0.1**	4.4±1.5	1.3±0.4**	6±3	2.3±0.9*	5.3±2.0	1.4±0.7	6.6±2.4	1.0±0.1**	8±5	0.5±0.2*
Intestinal content	4.4±1.5	2.1±1.0**	4.1±1.0	1.5±0.6**	43±21	6.7±2.1*	14±6	2.9±1.0	23±13	10±4	19±11	6±4*
Feces in colon	0.3±0.1	0.08±0.02**	0.5±0.2	0.07±0.03**	4.9±2.0	1.1±0.8**	4.2±2.0	0.8±0.3	8.2±2.1	0.4±0.2**	21±16	0.4±0.2*
Small intestine	4.6±1.1	1.5±0.6**	13±3	4.1±1.3**	21±11	5.5±2.3*	19±9	5.9±1.0	13±7	6±4	32±16	3.4±0.8*
Spleen	2.1±0.7	0.8±0.2**	14±3	4.1±1.3**	12±7	3.9±1.2	19±7	8.3±2.0	7.3±1.7	1.7±0.5**	25±6	2.5±0.6**
Pancreas	1.9±0.4	0.8±0.3**	6.8±1.7	2.1±0.8**	15±9	3.2±1.2*	13±7	3.0±1.5	8.7±2.7	1.7±1.0**	12±3	1.3±0.7**
Liver	3.4±1.5	1.9±0.6**	16±4	5.2±1.5**	14±5	4.3±1.3*	13±5	6.2±1.5	9±3	2.3±1.1**	21±10	1.4±0.4**
Kidney	33±15	4.4±1.3*	240±116	29±6*	192±60	52±14**	436±142	132±28**	82±10	16±3**	351±137	28±5**
Bladder	5.2±1.8	0.9±0.4**	16±5	2.4±1.3**	23±12	14±7	25±9	10±4	29±21	6±4	19±13	2.7±0.4
Submandibular gland	3.3±0.4	1.2±0.6**	13±3	5.5±1.4**	15±8	5.2±1.4*	31±20	9.9±1.5	11±4	2.3±0.8**	26±4	4.2±2.4**
Eye-ball	1.4±0.2	0.7±0.2**	4.6±0.8	1.7±0.4**	10±6	2.8±1.2	12±5	3.0±0.8	5.6±1.4	1.4±0.2**	5.9±1.7	0.9±0.1**
Thymus	1.9±0.6	0.9±0.3**	5.2±1.6	2.9±0.7*	12±6	3.2±1.6*	8±2	2.6±0.9	7.9±2.1	1.6±0.2**	10±4	0.8±0.2**
Lungs	4.9±1.8	2.8±0.8*	32±9	15±4**	21±11	8±4*	36±20	13±3	17±4	3.0±0.9**	40±32	2.5±1.1
Heart	1.7±0.3	1.5±0.5	10±2	10±4	10±4	3.1±1.1*	15±4	6.0±1.6	6.1±1.6	1.3±0.4**	14±3	1.5±0.3**
Thyroid gland/%	0.095±0.003	0.0014±0.0003	0.020±0.003	0.006±0.001**	0.05±0.030	0.011±0.004*	0.8±0.6	0.11±0.06	0.11±0.03	0.04±0.01**	3.4±1.7	0.9±0.3*
Bone marrow/femur	0.12±0.04	0.04±0.02*	0.12±0.06	0.04±0.03*	0.41±0.23	0.16±0.09	0.2±0.1	0.07±0.04	0.40±0.14	0.07±0.02**	0.3±0.4	0.013±0.003

[△] and ^{△△} were collected from a group of 5 rats with both sexes. ± s, n=5. * P<0.05, ** P<0.01, compared with ed group.

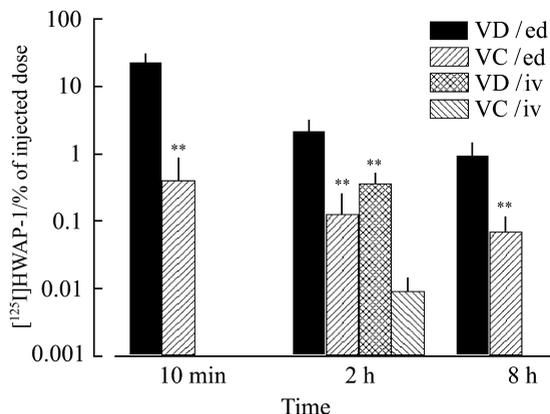


Fig 2. Percentage of injected radioactivity in vertebra + dura mater (VD) and vertebra core (VC), 10 min, 2 h, and 8 h after ed and iv injection of [^{125}I]HWTX-I. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with ed in the same time group.

min时大多数组织放射性iv组比ed组高3~4倍,给药2 h后两种给药途径大部分组织均无明显差别。

大鼠 ed [^{125}I]HWTX-I后多数组织在2 h后达峰值,心脏、肺、胸腺在10 min时最高。各组织放射性浓度由高到低为:尿>肾>肠内容>血清>膀胱>小肠>肺>颌下腺>脾>肝>心脏>肾上腺>胰腺>生殖腺>胸腺>眼球>肠内粪>淋巴结>肌肉>脂肪>脑。ed后10 min和2 h甲状腺总放射性浓度分别占注入放射性的 $0.03\% \pm 0.01\%$ 和 $0.60\% \pm 0.35\%$ 。

iv后多数组织在10 min达峰值,各组织药物浓度从高到低为:肾>肺>血清>膀胱>小肠>肠内容>颌下腺>脾>肝>肠内粪>胰腺>肾上腺>心脏>胸腺>生殖腺>淋巴结>眼球>肌肉>脑>脂肪。iv后10 min和2 h甲状腺总放射性浓度分别占注入放射性的 $0.12\% \pm 0.02\%$ 和 $0.84\% \pm 0.55\%$ 。

3 讨论

本研究采用[^{125}I]标记结合TCA沉淀法研究体内各组织的分布,虽然不能精确分辨原型药物与代谢产物,但结合RP-HPLC法,可在检测到原型药物的前提下将TCA可溶部分视为游离型的原药及降解物,将TCA沉淀部分视为蛋白结合型药物。

ed和iv两种给药方式的组织分布随时间进程的变化明显不同。注射后10 min大多数组织放射性iv组比ed组高3~4倍,表明在给药早期,iv后全身暴露量高于ed,给药2 h后两种给药途径大部分组织均无明显差别。iv后药物较快地分布于各组织,且消除较快。ed组血清浓度在2 h达峰值,各组织内药物浓度维持在一定水平,提示ed给药后可能存在一个药物自椎管硬膜外腔缓慢释放入血的动态过程,而大多数组织中药物浓度保持在较低水平,全身暴露量较iv组低。这种分布特征对药物发挥稳定镇痛疗效是有利的。该结果与药效学实验中HWTX-I的镇痛效果可长达数小时的结果是一致的(内部资料)。结合上述两种给药方式不同的组织分布特征,可进一步说明HWTX-I采用ed给药方式更安全。

两种给药方式下都表现出泌尿系统的药物浓度远远高于血清,显示药物主要通过尿排泄。脑和脂肪、肌肉等组织药物浓度最低,显示药物不容易通过血脑屏障或在疏水性组织中分布低。

本实验仅能从[^{125}I]HWTX-I在血清或组织中存在于10% TCA的沉淀部分推断HWTX-I与体内蛋白结合,这个问题还有待于进一步深入研究。

4 参考文献:

- [1] Liang SP, Zhang DY, Pan X, Chen Q, Zhou PA. Properties and amino acid sequence of huwentoxin-I, a neurotoxin purified from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwenna*[J]. *Toxicon*, 1993, **31**(8):969-978.
- [2] Liang SP, Chen XD, Shu Q, Zhang Y, Peng K. The presynaptic activity of huwentoxin-I, a neurotoxin from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwenna*[J]. *Toxicon*, 2000, **38**(9):1237-1246.
- [3] Bowersox SS, Gadbois T, Singh T, Pettus M, Wang YX, Luther RR. Selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, SNX-III, produces spinal antinociception in rat models of acute, persistent and neuropathic pain[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, **279**(3):1243-1249.
- [4] Liu XW, Tang ZM, Chai BX. Preparation of high purified ^{125}I -venom neural growth factor[J]. *J Isotopes*, 1998, **11**(11):144-148.
- [5] Liang SP. Determination of biological activity of huwentoxin [J]. *Res Animals*, 1993, **14**(1):65-70.
- [6] Wong CH, Dey P, Yarmush J, Wu WH, Zbuzek VK. Nifedipine-induced analgesia after epidural injection in rats [J]. *Anesth Analg*, 1994, **79**(2):303-306.

Distribution profiles of huwentoxin-I after epidural and intravenous administration in rats

LIAO Zhi², DAI Shu-Jia¹, LIU Xiu-Wen^{1*}, LIANG Song-Ping², TANG Zhong-Ming¹

(1. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China; 2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: **AIM** To compare the bio-distribution of ¹²⁵I-labeled huwentoxin-I (¹²⁵I]huwentoxin-I, a novel analgesic peptide purified from the venom of spider *Selenocosmia huwenna*) after epidural (ed) and intravenous injection (iv) 13.2 kBq · g⁻¹ in rats. **METHODS** [¹²⁵I] huwentoxin-I was prepared with iodogen methods and purified by gel filtration. The purity of [¹²⁵I]huwentoxin-I identified by reverse phase high performance liquid chromatography was 98.5% and exhibited biological activity assayed by mouse phrenic nerve-diaphragm preparation *in vitro*. **RESULTS** Radioactivity in dural-vertebral samples was significantly higher after ed than after iv, indicating a successful injection of [¹²⁵I]huwentoxin-I into epidural space. Radioactivity in epidural space declined post-injection

and sustained for a long time after ed injection. Radioactivity showed a gradient in body tissues following ed injection. The distribution profiles after iv were similar to ed but higher in most tissues. The highest concentrations in most tissues were found at 2 h following ed injection and at 10 min after iv. **CONCLUSION** The bio-distribution profiles following epidural injection confirmed the higher concentration in dural-vertebral samples and lower peak concentration in serum.

Key words: huwentoxin-I; injection, epidural; distribution, tissue

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(39930180)

(本文编辑 石 涛)