

^{125}I 标记重组人血小板生成素的小鼠体内分布和代谢特征

梁 婷, 侯桂华, 张 超, 宋 静

(山东大学 医学院实验核医学研究所, 山东 济南 250012)

摘要: 建立了 ^{125}I 标记重组人血小板生成素(rhTPO)的标记方法, 并研究其在小鼠体内分布及药物动力学特征, 为临床应用提供参考。利用 Iodogen 法制备 ^{125}I -rhTPO, 纸层析法检测放化纯度, 凝胶过滤层析法测定标记率。制备的 ^{125}I -rhTPO 放化纯度为 95.85%, 标记率为 96.25%。尾静脉注射 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 ^{125}I -rhTPO, 在小鼠体内可以二室模型拟合血药浓度的动态变化, $T_{1/2\alpha}$ 为 0.30 h, $T_{1/2\beta}$ 为 6.20 h。 ^{125}I -rhTPO 在小鼠体内主要经肾脏排泄, 部分可经肝胆系统代谢。在各骨组织中以富含骨髓细胞的胸骨放射性计数最高, 股骨次之, 而乏骨髓的胫骨放射性计数最低, 提示骨髓是 rhTPO 作用的靶组织。

关键词: ^{125}I 标记; 血小板生成素(TPO); 代谢; 分布

中图分类号: TQ463.7; R817-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-7512(2007)02-0083-04

Study on Distribution and Metabolism of ^{125}I -recombinant Human Thrombopoietin in Mice

LIANG Ting, HOU Gui-hua, ZHANG Chao, SONG Jing

(Institute of Experimental Nuclear Medicine, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: To establish the ^{125}I -rhTPO labeling method and study the pharmacokinetics and investigate the distribution of ^{125}I -rhTPO in mice, ^{125}I -rhTPO is prepared by Iodogen solid labeling method, and is isolated and purified by Sephadex-G25 agarose. The radiochemical purity of labeled protein is analyzed by paper chromatography. It is shown that the labeling efficiency of ^{125}I -rhTPO is 96.25%, radiochemical purity is 95.85%. The distribution of ^{125}I -rhTPO in mice is measured at different times after caudal vein injection with $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ^{125}I -rhTPO. The pharmacokinetics of ^{125}I -rhTPO following i. v. with $1\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in mice is fit to two-compartment model, $T_{1/2\alpha}$ is 0.30 h, $T_{1/2\beta}$ is 6.20 h. The distribution of ^{125}I -rhTPO in different organs show that most of ^{125}I -rhTPO is metabolized by the kidney, a little of ^{125}I -rhTPO is metabolized by the liver and gall system. The radioactivity level in breastbone is higher than it in thighbone and shinbone, the radioactivity level in shinbone is the lowest.

收稿日期: 2006-12-29; 修回日期: 2007-01-30

基金项目: 本课题为山东科委资助项目, 编号 981154504

作者简介: 梁婷(1977~), 女(汉族), 讲师(硕士), 实验核医学专业, E-mail: liangting@sdu.edu.cn, 电话: 0531-88382096

通讯作者: 侯桂华, 女, 博士生导师, E-mail: ghhou@sdu.edu.cn, 电话: 0531-88382096

It suggests that the bone marrow is the target of the rhTPO.

Key words: ^{125}I labeling; thrombopoietin(TPO); metabolism; distribution

血小板生成素(thrombopoietin, TPO)是调节巨核细胞系造血的特异性细胞因子,由 21 个氨基酸的信号肽和两个结构域组成,共 353 个氨基酸。TPO 可作用于巨核细胞系的祖细胞,刺激 $\text{CD}34^+$ 细胞向巨核细胞分化,也可作用于晚期巨核细胞,影响巨核细胞数目、大小及形态^[1]。除具有促血小板生成的作用外, TPO 还参与免疫细胞的发育,提高机体免疫力,具有抗肿瘤作用^[2,3]。目前国内外关于 TPO 在肝病、肿瘤、自身免疫病状态下的水平及意义的研究已成为热点^[4~6]。

近年来有关造血干细胞移植(HSCT)的研究进展迅速,但是 HSCT 后造血重建缓慢、长期免疫功能低下及移植物抗宿主病(GVHD)等问题仍然缺乏有效处理手段,严重影响了 HSCT 成功率,是目前亟待解决的问题。TPO 作为血小板生成最主要的调节因子,是造血干细胞(HSC)、单核细胞、粒细胞、肥大细胞和树突细胞等发育所需的重要细胞因子之一。体内和体外研究表明, TPO 可以广泛扩增干细胞数量,加速干细胞进入细胞周期,刺激造血干细胞的存活和增殖。TPO 联合 EPO、干细胞因子(SCF)等细胞因子具有促进髓系和红系祖细胞生长的作用^[7]。TPO 在肿瘤、自身免疫病状态下的作用也同样引起了广泛的关注。随着基因工程技术的不断改进和完善,已有研究者尝试将基因重组 TPO 用于 HSCT 后造血和免疫功能重建。国外一些临床前及临床 I、II 期试验已显示了重组人 TPO(rhTPO)治疗及改善血小板减少症的临床价值,但有关 rhTPO 制剂的安全使用及合理用药仍缺乏相关的实验参考数据。

鉴于此,利用基因工程技术制备 rhTPO 并将其用于临床诊断与治疗是现阶段研究的方向。有关 rhTPO 重组表达载体的构建及表达方法已日趋成熟,但针对 rhTPO 在体内的药代动力学及分布特征的研究较少。为充分了解 rhTPO 在动物体内的各种生物学行为,本工作选用 ^{125}I 标记 rhTPO,对 TPO 在小鼠体内的代谢、分布特征进行初步探讨,为深入研究 TPO 作用机理奠

定基础。

1 实验材料

rhTPO:本实验室从人胎肝细胞中提取 cDNA,利用 DNA 重组技术构建了重组人 TPO 原核表达质粒 pQE30-TPO,经原核系统表达并纯化得到^[8];BALB/c 小鼠:体重 18~20 g,清洁级,山东大学实验动物中心;无载体 ^{125}I :中国原子能科学研究院同位素研究所;葡聚糖凝胶 Sephadex G-25:SIGMA 公司;Iodogen 涂管:自制;GC911 γ -计数器:科大中佳公司;放射性活度计:美国 CAPINTEC 公司。

2 实验方法

2.1 ^{125}I -rhTPO 制备

采用 Iodogen 法标记 rhTPO。取 100 μL pH 7.4 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(PB)加入到涂有 Iodogen 的管内,再加入 2 μg rhTPO 和约 11.1 MBq Na^{125}I ,缓慢轻摇以充分反应,20 min 后加入 100 μL 0.05 mol/L (pH 7.4) PB 终止反应,静置 10 min 后加入 100 μL 5% BSA。将反应体系移入 Sephadex G-25 凝胶中,采用 0.01 mol/L pH 7.4 的 PB 淋洗液,自动部分收集器收集滤出液,1 mL/管/3 min,分别测定各管的放射性计数。

2.2 ^{125}I -rhTPO 标记率与放化纯度分析

凝胶过滤层析法测量标记化合物的标记率。采用新华 1 号滤纸,以 $V(\text{正丁醇}):V(\text{乙酸}):V(\text{水})=4:1:1$ 作为展开体系,测量其放化纯度。为探讨 ^{125}I -rhTPO 在体外的稳定性,将标记物分别置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 和室温下,72 h 后仍用上述纸层析法检测其放化纯度。

2.3 ^{125}I -rhTPO 在小鼠体内血药浓度的变化

随机取 BALB/c 小鼠 27 只(体重 18~20 g),尾静脉注射 0.2 mL (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ^{125}I -rhTPO。注射后分别于第 5、10、15、30、45 min、1、3、6、12、24、48 h 眶静脉取血(每个时间点取 3 只小鼠)。各取 100 μL 血浆,加入 1.6 mL 10% 三氯醋酸,3 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,测量沉

淀部分放射性,并根据标记物的比活度计算 rhTPO 的含量。

2.4 ¹²⁵I-rhTPO 在小鼠体内的生物学分布

取 BALB/c 小鼠 21 只随机分为 7 组,每组 3 只,尾静脉注射 0.2 mL (1 μg/kg) ¹²⁵I-rhTPO。注射后分别在第 30 min、1、3、6、12、24 h 处死小鼠(每个时间点取 3 只小鼠),取小鼠不同组织器官,称重并测量其放射性计数,计算各组织器官放射性摄取(%·g⁻¹)。

3 结果与讨论

3.1 ¹²⁵I-rhTPO 的标记及其稳定性

根据洗脱液放射性计数率可知,蛋白峰出现在 9~11 管,游离峰出现在 21 管。计算得标记率为 96.25%,比活度为 1.85 GBq/mg,纸层析结果显示 ¹²⁵I 与 ¹²⁵I-rhTPO 的 R_f 分别为 0.7 和 0.2,放化纯度为 95.85%;将 ¹²⁵I-rhTPO 分置于 4 °C 和室温,72 h 后,置于 4 °C 的 ¹²⁵I-rhTPO 放化纯度仍大于 95%,室温下的 ¹²⁵I-rhTPO 放化纯度仍大于 92%,说明 ¹²⁵I-rhTPO 具有很好的体外稳定性。

3.2 ¹²⁵I-rhTPO 药物动力学参数

¹²⁵I-rhTPO 的药时曲线示于图 1。由图 1 可见注射 ¹²⁵I-rhTPO 后,血药浓度迅速达到峰值,在体内的代谢清除过程符合二室分布模型的动力学特征。应用 DSA Ver1.0 药代动力学统计程序拟合分析各时相血药浓度可得:分布相半衰期 $T_{1/2\alpha}=0.30$ h,清除相半衰期 $T_{1/2\beta}=6.20$ h,药时曲线下面积 AUC 为 114.67 μg·h·L⁻¹。¹²⁵I-rhTPO 的相关药代动力学各参数分别为:A 9.44 mg·L⁻¹、α 2.40 h⁻¹、B 10.30 mg·L⁻¹、β 0.11 h⁻¹、 $T_{1/2\alpha}$ 0.30 h、 $T_{1/2\beta}$ 6.20 h、 K_{21} 1.31 h⁻¹、 K_{10} 0.21 h⁻¹、 K_{12} 1.00 h⁻¹、AUC 114.67 mg·L⁻¹、MRT 10.74 h。与其他细胞因子相比较,其清除半衰期较长,这可能是由于 TPO 相对分子质量较大和高度糖基化延迟了其在小鼠体内的代谢过程,这将有利于 TPO 在体内充分发挥生物学作用。在上述药代动力学研究中,为避免游离碘干扰 ¹²⁵I-rhTPO 放射性的测

定,采用 10% 三氯醋酸沉淀蛋白,将上清液中的游离碘弃去,仅测量沉淀部分的放射性,使测定的结果更加可靠。这种分析方法对其他 ¹²⁵I 标记蛋白药代动力学研究有重要参考意义。

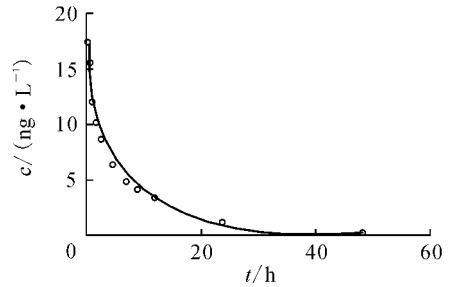


图 1 小鼠尾静脉注射 ¹²⁵I-rhTPO 1 μg·kg⁻¹ 时血药浓度曲线

3.3 ¹²⁵I-rhTPO 在小鼠体内的生物学分布

小鼠尾静脉注射 ¹²⁵I-rhTPO 后,不同时间各组织的放射性变化列于表 1。由表 1 可知,心肺内放射性变化与血同步,随时间增加逐渐减弱;除血液、心肺外,肾内放射性计数最高,1 h 达到峰值,然后迅速下降,3 h 时下降至约一半,6 h 后缓慢下降;肝内放射性计数次之,变化趋势同肾脏;甲状腺内放射性计数介于肌肉与其他器官之间,表明 ¹²⁵I-rhTPO 在体内稳定,游离很少;各组织中以肌肉和肠组织的放射性计数最低。体内放射性分布研究表明,¹²⁵I-rhTPO 主要经肾脏排泄,部分可经肝胆系统代谢。

3.4 ¹²⁵I-rhTPO 在骨组织中的分布

注射 ¹²⁵I-rhTPO 后各时间点内各骨组织与血液的放射性摄取比(T/NT)列于表 2。由表 2 可知,注射后 30 min,各骨组织与全血的放射性摄取比 T/NT 均较低,在注射后 12 h 才达到高峰,以胸骨与血液的 T/NT 最高,股骨次之,胫骨最低。注射后 24 h,¹²⁵I-rhTPO 在各骨组织中的分布均有所减少。各骨组织 ¹²⁵I-rhTPO 的 T/NT 变化基本一致,在各时间点中均以富含骨髓细胞的胸骨的 T/NT 最高,而乏骨髓的胫骨最低,提示骨髓是 TPO 发挥促血小板生成作用的靶组织。通过上述研究明确了 rhTPO 在体内的代谢分布特征,为下一步指导临床应用、制定合理的给药方案奠定了实验基础。

表 1 尾静脉注射¹²⁵I-rhTPO 在小鼠体内的分布 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组织	不同时间的放射性摄取/(%·g ⁻¹)					
	30 min	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
血液	36.97±0.60	33.43±1.62	24.54±3.38	16.85±1.39	13.99±0.86	4.66±0.37
心脏	10.07±0.14	6.03±0.03	2.67±0.09	2.41±0.09	1.34±0.19	0.46±0.04
肺	8.12±0.05	7.83±0.39	9.02±0.25	4.73±0.19	1.59±0.06	1.15±0.10
肝	7.09±0.57	5.43±0.19	3.98±0.27	2.64±0.15	2.52±0.21	0.57±0.04
脾	3.91±0.07	3.03±0.12	2.86±0.32	2.49±0.32	1.69±0.25	0.43±0.01
肾	11.35±0.25	11.59±0.37	6.31±0.57	4.99±0.09	4.56±0.65	1.07±0.09
小肠	2.43±0.45	2.60±0.03	1.53±0.46	1.30±0.09	1.21±0.12	0.39±0.08
甲状腺	3.31±0.09	5.59±0.23	3.69±0.36	2.26±0.09	2.41±0.06	0.59±0.14
肌肉	0.59±0.02	0.65±0.03	0.70±0.04	1.04±0.15	0.77±0.02	0.27±0.02
胫骨	1.39±0.43	1.29±0.15	1.16±0.05	1.05±0.05	1.05±0.16	0.26±0.12
股骨	2.02±0.29	2.05±0.28	1.43±0.28	1.27±0.22	1.22±0.08	0.29±0.23
胸骨	3.07±0.07	4.27±0.35	3.58±0.26	2.67±0.20	2.31±0.29	0.53±0.02

表 2 尾静脉注射¹²⁵I-rhTPO 在小鼠骨组织内的分布 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	不同时间的 T/NT					
	30 min	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
胸骨/血液	8.30±1.97	12.78±1.05 ¹⁾	14.61±1.04 ¹⁾	15.87±1.19 ¹⁾	16.52±0.50 ¹⁾	11.34±0.61 ¹⁾
股骨/血液	5.48±1.96	6.12±0.84	5.28±1.13	7.52±1.28	8.70±0.56	6.40±0.35
胫/血液	3.78±1.17	3.86±0.44	4.71±0.44	6.21±0.24	7.47±1.13	5.62±0.56

注:胸骨与胫的 T/NT 相比, $P<0.01$

参考文献:

- [1] GURNEY AL, KUANG WJ, XIE MH, et al. Chromosomal, Localization and Conserved Alternative Splice Forms of Thrombopoietin Blood[J]. Genomic Structure, 1995, 85(4): 981-988.
- [2] AMADO RG, SYMONDS G, JAMIESON BD, et al. Effects of Megakaryocyte Growth and Development Factor on Survival and Retroviral Transduction of T Lymphoid Progenitor Cells[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(2): 173-183.
- [3] BELLA SD, NICOLA S, TIMOFEEVA I, et al. Are Interleukin-16 and Thrombopoietin New Tools for The in Vitro Generation of Dendritic Cells? [J]. Blood, 2004, 104 (13): 4 020-4 028.
- [4] TSUKAHARA A, SATO Y, YAMAMOTO S, et al. Thrombopoietin Levels and Peripheral Platelet Counts Following Living Related Donor Liver Transplantation[J]. Hepatogastroenterology, 2003, 50(49): 227-230.
- [5] KIRAZ S, ERTENLI I, OZTURK MA, et al. Bloodstream Thrombopoietin in Rheumatoid Arthritis With Thrombocytosis[J]. Clin Rheumatol, 2002, (21): 453-456.
- [6] WERYNSKA R, RAMLAU, PODOLAK-DAWIDZIAK M, et al. Serum Thrombopoietin Levels in Patients With Reactive Thrombocytosis Due to Lung Cancer and in Patients With Essential Thrombocythemia[J]. Neoplasma, 2003, (50): 447-451.
- [7] KIRSHENBAUM AS, AKIN C, GOFF JP, et al. Thrombopoietin Alone or in the Presence of Stem Cell Factor Supports the Growth of KIT (CD117) (low) /MPL (CD110) (+) Human Mast Cells From Hematopoietic Progenitor Cells [J]. Exp Hematol, 2005, 33 (4): 413-421.
- [8] 侯桂华, 梁婷, 李璐娜, 等. rhTPO 在大肠杆菌中的表达、纯化及生物活性分析[J]. 山东大学学报: 医学版, 2003, 41(4): 375-377.