

论著·基础研究

亚甲基丁二酸在雄性 C57BL/6J 小鼠体内半数致死量和半衰期的测定

郭阳阳^{1,2}, 雷和花², 王玉兰³

1. 中国科学院大学, 北京 100049; 2. 中国科学院精密测量科学与技术创新研究院波谱与原子分子物理国家重点实验室武汉磁共振中心, 武汉 430071; 3. 新加坡表型中心, 李光前医学院, 生命科学院, 南洋理工大学, 新加坡 639646

[摘要] 目的·测定亚甲基丁二酸 (itaconic acid, ITA) 在小鼠体内的半衰期和半数致死量, 为评价 ITA 在体内的代谢速率和毒性提供直观的数据。**方法**·采用尾静脉注射将 ITA 注入小鼠体内, 在不同的时间点通过眼底静脉丛采血测得 ITA 的浓度; 同时, 给药后连续观察 14 d, 记录受试小鼠的存活情况。**结果**·ITA 在雄性 C57BL/6J 小鼠体内的半衰期为 29.13 min, 半数致死量为 258.263 mg/kg。**结论**·ITA 在小鼠体内的代谢速率较快, 半衰期较短, 属于超快速消除类药物; 其在小鼠体内的半数致死量显示毒性较低。

[关键词] 亚甲基丁二酸; 小鼠; 半数致死量; 半衰期

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.11.006 **[中图分类号]** R965.3 **[文献标志码]** A

Determination of half-life and half-lethal dose of itaconic acid in C57BL/6J male mice

GUO Yang-yang^{1,2}, LEI He-hua², WANG Yu-lan³

1. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 2. State Key Laboratory of Spectroscopy and Atomic and Molecular Physics, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan Magnetic Resonance Center, Wuhan 430071, China; 3. Singapore Phenome Center, Lee Kong Chian School of Medicine, School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, Singapore 639646, Singapore

[Abstract] Objective·To determine the half-life and half-lethal dose of itaconic acid in mice, and provide intuitive data for the metabolic rate and toxicity of itaconic acid in mice. **Methods**·Itaconic acid was injected into mice through caudal vein. The concentration of itaconic acid was measured by blood collection under fundus venous plexus at different time. At the same time, the survival of the mice was recorded after injection for 14 d. **Results**·Under the conditions of this experiment, the half-life of itaconic acid in male C57BL/6J mice was 29.13 min, and the half-lethal dose of is 258.263 mg/kg. **Conclusion**·Itaconic acid has a fast metabolic rate and a short half-life in mice. Itaconic acid is less toxic, based on its half-lethal dose in mice.

[Key words] itaconic acid; mouse; half-life; half-lethal dose

亚甲基丁二酸 (itaconic acid, ITA) 又名衣康酸、甲叉琥珀酸, 是一种不饱和二元有机酸, 因其具有活泼的化学性质, 是化学工业的重要原料^[1]。目前, 大多数的 ITA 是由土壤真菌土曲霉发酵产生的^[1]。在生物体内, ITA 是由三羧酸循环的中间产物顺乌头酸经顺乌头酸脱羧酶 (*cis*-aconitic acid decarboxylase, CAD) 催化生成^[2]。在哺乳动物体内 CAD 就是免疫应答基因 -1 蛋白 (immune-responsive gene 1 protein, IRG1)^[2], IRG1 是哺乳动物体内一种重要的免疫蛋白, 是免疫代谢中的关键成分, 是产生 ITA 的关键酶。已有研究^[3]证明 ITA 可以抑制细菌体内的乙醛酸循环中的异柠檬酸裂合酶而达到其抗菌的效果。

ITA 在巨噬细胞的线粒体合成后, 可以抑制琥珀酸脱氢酶的活性^[4]。与此同时 ITA 也可以分泌到胞浆中抑制 KEAP1 的活性, 从而激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2), 导致 IFN γ 和 IL-1 β 的含量降低^[4], 使机体的炎症反应减轻。急性毒理实验可以初步了解外源化学物质急性毒性强度, 从而评价外源化学物质的安全性^[5]。药物半衰期 (half-life) 是外源性药物在体内代谢的重要参考^[6]。因此, 本文测定了 ITA 的半数致死量 (half-lethal dose, LD₅₀) 来评价其安全性, 同时测定了半衰期来作为 ITA 在体内代谢的一个参数, 为动物实验给药的剂量和时间提供重要的依据。

[基金项目] 国家重点研发计划 (2017YFC0906800)。

[作者简介] 郭阳阳 (1993—), 男, 硕士生; 电子信箱: guoyy12@lzu.edu.cn。

[通信作者] 王玉兰, 电子信箱: yulan.wang@ntu.edu.sg。

[Funding Information] National Key Research and Development Program (2017YFC0906800)。

[Corresponding Author] WANG Yu-lan, E-mail: yulan.wang@ntu.edu.sg。

1 对象与方法

1.1 试剂与仪器

ITA 购于萨恩化学技术 (上海) 有限公司, 生产批号 BH290028; 生理盐水购于武汉滨湖双鹤药业有限责任公司, 生产批号 1905300801; HPLC 级别甲醇、甲酸、乙腈购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 生产批号 19045130。Agilent 6460 UPHLC-ESI-QqQ 仪器购于美国 Agilent 公司。

1.2 实验动物

8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [许可证编号 SCKK (湘) 2016-0002], 饲养于中国科学院精密测量科学与技术创新研究院小洪山园区 SPF 级实验动物中心动物房 [实验动物使用许可编号 SYXK (鄂) 2015-0051]。适应性饲养 2 周, 小鼠自由摄取食物和水。温度 21 ~ 25℃, 湿度 45% ~ 70%, 换气次数 30 ~ 50 次/h, 光照/黑暗的自动切换时间 12 h。半数致死量实验中 LD₀ 和 LD₁₀₀ 组每组 6 只小鼠, 共分为 7 组, LD₅₀ 组每组 12 只小鼠, 共分为 6 组。本研究经中国科学院精密测量科学与技术创新研究院伦理委员会批准。

1.3 色谱质谱实验

取 50 μL 小鼠血浆样品, 100 μL 甲醇, 50 μL 超纯水, 混匀后离心取上清。上清液用 0.45 μm 滤头过滤至进样瓶中。使用超高效液相色谱系统和 QQQ 串联质谱分析器的 Agilent 6460 三重四极杆系列采集数据, 超高效液相色谱系统是配备了 G4220A 二元泵和 G4226 自动进样器的 Agilent 1290 系列。流动相 A 是水 +0.01% 甲酸, 流动相 B 是乙腈。色谱柱使用 Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 μm, 50 mm × 2.1 mm)。色谱条件: 流速 0.25 mL/min; 温度 40℃; 进样量 0.5 μL。质谱采用单离子检测 (single ion monitoring, SIM) 负离子模式。

1.4 半衰期和半数致死量实验

经尾静脉将 ITA 注射进小鼠体内。注射完成后开始计时, 并于注射后 0.5 h 和 2 h 时采集小鼠眼底静脉丛血液, 4℃ 静止 4 h, 取上清制成血浆样品待测。小鼠经尾静脉注射不同浓度的 ITA 后连续观察 14 d 小鼠的状态和存活情况并记录, 将记录的数据采用 SPSS 18.0 软件计算得出半数致死量和半衰期。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 方法。实验中涉及的谱图数据采用 Mass Hunter 定性软件 (Agilent, B.06.00) 和 Mass Hunter 定量软件 (Agilent, B.06.00) 处理。

2 结果

2.1 ITA LD₅₀ 的测定

ITA 经尾静脉注射入 C57BL/6J 雄性小鼠体内, 观察 14 d 后小鼠的存活情况。通过注射 5、50、500 mg/kg 的剂量确定受试浓度应该在 50 ~ 500 mg/kg (表 1)。随后, 通过注射 100、200、300、400 mg/kg 的剂量确定合适的受试浓度应在 200 ~ 400 mg/kg (表 2)。最后, 在合适浓度范围内设置了 5 个浓度进行实验 (表 3)。

表 1 ITA 对 C57BL/6J 雄性小鼠的 LD₀ 和 LD₁₀₀
Tab 1 LD₀ and LD₁₀₀ of ITA in C56BL/6J male mice

Dose / (mg · kg ⁻¹)	Total number of animals tested/n	Death/n	Mortality/%
5	6	0	0
50	6	0	0
500	6	6	100

表 2 ITA 对 C57BL/6J 雄性小鼠的 LD₀ 和 LD₁₀₀
Tab 2 LD₀ and LD₁₀₀ of ITA in C56BL/6J male mice

Dose / (mg · kg ⁻¹)	Total number of animals tested/n	Death/n	Mortality/%
100	6	0	0
200	6	0	0
300	6	3	50
400	6	6	100

表 3 ITA 对 C57BL/6J 雄性小鼠的 LD₅₀
Tab 3 LD₅₀ of ITA in C56BL/6J male mice

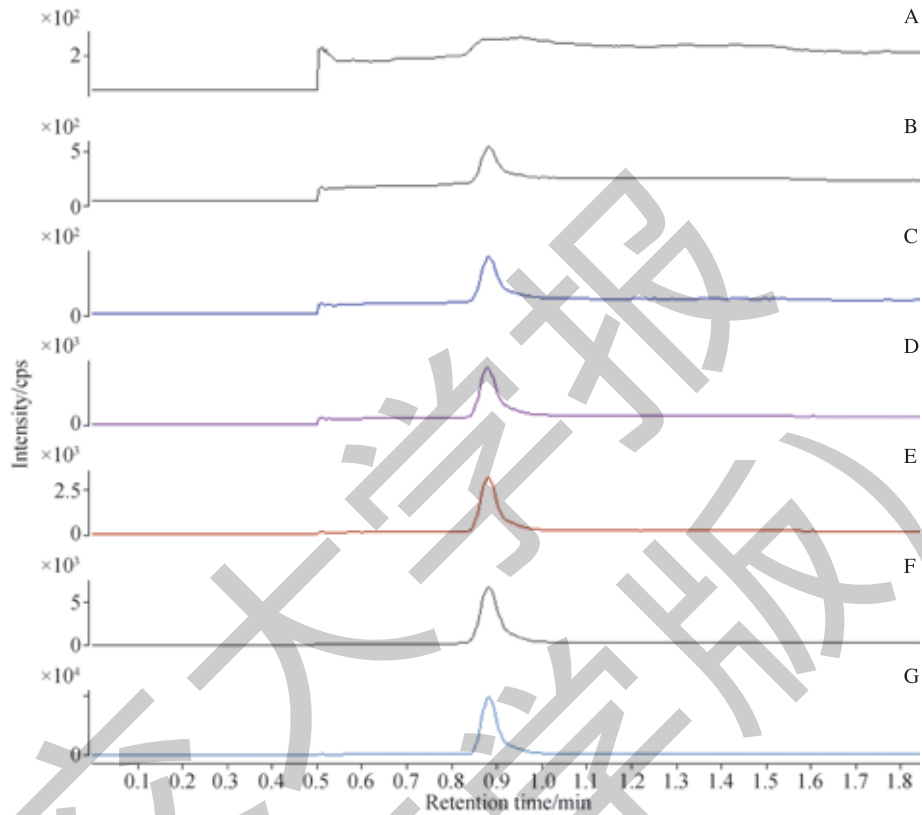
Dose / (mg · kg ⁻¹)	Total number of animals tested/n	Death/n	Mortality/%
235	12	4	33
270	12	8	67
303	12	8	67
340	12	10	83
375	12	12	100

根据以上数据利用 SPSS 18.0 软件计算出 ITA 的 LD₅₀=258.263 mg/kg, 95%CI 为 (258.263 ± 2.412) mg/kg。

2.2 ITA 半衰期的测定

ITA 经尾静脉注射入小鼠体内, 注射剂量根据之前 LD₅₀ 的结果, 选择 100 mg/kg, 分别于注射后 0.5、2 h 眼底静脉丛取约 500 μL 的全血制成血浆待测。称取 1.000 0 g ITA 溶于超纯水, 梯度稀释, 依次配置浓度为 0、0.001、

0.002、0.01、0.1、0.2、0.5 μg/mL 的标准品溶液。标准溶液的色谱图 (图 1) 和质谱图 (图 2) 中, ITA 的峰形良好, 无杂质被检测到, 浓度 (x) 和峰面积 (y) 线性回归方程为 $y=53\ 055.467\ 880 \times x$ ($R^2=0.994\ 892\ 91$)。共测定 3 只 C57BL/6J 雄性 10 周龄小鼠的 ITA 半衰期 (表 4)。



Note: The concentration of ITA is 0 μg/mL (A), 0.001 μg/mL (B), 0.002 μg/mL (C), 0.01 μg/mL (D), 0.1 μg/mL (E), 0.2 μg/mL (F) and 0.5 μg/mL (G).

图 1 ITA 的色谱图结果

Fig 1 Chromatographic results of ITA

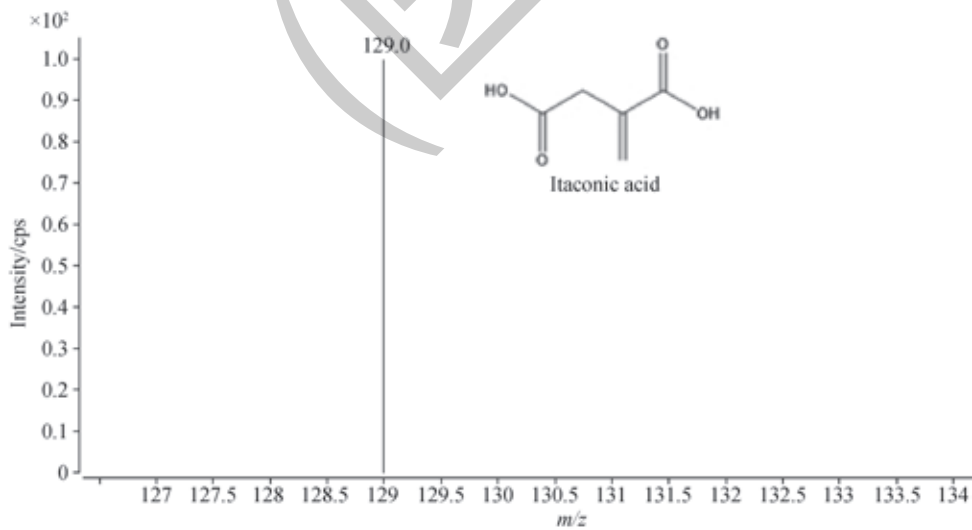


图 2 ITA 浓度为 0.02 μg/mL 的质谱图结果

Fig 2 Mass spectrum of ITA at 0.02 μg/mL

表 4 ITA 在 C57BL/6J 雄性小鼠体内的半衰期
Tab 4 Half-life of ITA in C57BL/6J male mice

Number	0.5 h/ (nmol · L ⁻¹)	2 h/ (nmol · L ⁻¹)	Half-life/ h
1	0.164 2	0.036 7	0.693 8
2	0.239 8	0.010 3	0.330 2
3	0.489 2	0.044 2	0.432 4

Note: Concentrations of ITA in serum of C57BL/6J male mice at different time. *h*—Half-life.

半衰期的计算公式为:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{k}$$
$$k = \frac{(\ln c_0 - \ln c_1)}{(t_0 - t_1)}$$

其中, *t*₀、*t*₁ 为采样的 2 个时间点, *c*₀、*c*₁ 为对应的浓度。

以上结果得出 ITA 在 C57BL/6J 小鼠体内的半衰期 *t*_{1/2}=0.485 5 h=29.13 min, 由此可见 ITA 在 C57BL/6J 小鼠体内循环的半衰期很短。

3 讨论

ITA 通过尾静脉注射入小鼠体内之后, 低剂量组别的小鼠没有任何明显的症状表现, 达到致死剂量的小鼠出现呼

吸加深、连续抽搐等症状, 并在 30 min 内死亡。根据本实验的结果, ITA 在小鼠体内属于代谢速率较高的一种药物。如果要通过体外注射的方法来增加 ITA 的浓度来研究其作用, 需要频繁给药, 从而使得多次操作刺激, 增加实验成本, 实验结果可信度降低。本实验所用的 ITA 的色谱质谱检测方法, 线性良好, 无杂质被检出, 结果可信。ITA 作为一种具有抗炎效果的物质^[3], 其抗炎的具体机制还没有被完全阐明, 本实验的结果为今后 ITA 的研究奠定了基础。

本实验条件下得出来的 ITA 的 LD₅₀ 为 258.263 mg/kg, 我国现行的急性毒性分级标准并没有静脉注射方式的标准, 但是通过对比其他文献^[7]的结果, ITA 的 LD₅₀ 属于较为安全的等级。在实验中, 小鼠的死亡都发生在注射后的 30 min 内, 按照标准的方法观察 14 d 未见小鼠继续死亡^[7], 由此可见 ITA 的毒性会在很短的时间内发作。根据半衰期的长短, 可将 ITA 归于超快速消除类 (*t*_{1/2} ≤ 1 h), 这类药物一般不会对机体内大量蓄积, 并且会很快被代谢或者排泄出体内^[8]。超快速消除类药物要达到作用的血药浓度需要增加给药次数或者使用静脉滴注的方式给药。当机体受到病原体入侵产生炎症时, 巨噬细胞在激活的状态下产生 ITA^[9], 使得体内的 ITA 能维持在一定水平。ITA 可以由机体细胞产生, 所以将来的研究可探索如何刺激体内的细胞产生更多的 ITA。

参 考 文 献

[1] Huang XN, Chen M, Li JJ, et al. Establishing an efficient gene-targeting system in an itaconic-acid producing *Aspergillus terreus* strain[J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(9): 1603-1610.

[2] Campe R, Langenbach C, Leissing F, et al. ABC transporter PEN3/PDR8/ABCG36 interacts with calmodulin that, like PEN3, is required for *Arabidopsis* nonhost resistance[J]. *New Phytol*, 2016, 209(1): 294-306.

[3] Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production[J]. *PNAS*, 2013, 110(19): 7820-7825.

[4] Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11624.

[5] 李雪健, 张谦, 邢玉舒, 等. 急性毒性实验的研究进展及缺陷 [C]// 中国药物毒理学会. 2017 年 (第七届) 药物毒理学会论文集. 山西.

[6] 李联营. 试分析药物半衰期与合理用药 [J]. *中国现代药物应用*, 2014, 8(7): 247-248.

[7] 李寅超, 王随华, 郭琰, 等. 冬凌草二萜类成分半数致死量的测定 [J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(2): 163-164.

[8] 李大猷. 青霉素静脉滴注的药物动力学及配伍禁忌 [J]. *青海医药杂志*, 1989, 19(1): 37-39.

[9] Strelko CL, Lu WY, Dufort FJ, et al. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(41): 16386-16389.

[收稿日期] 2019-12-27 [本文编辑] 徐 敏