

文章编号:1673-1689(2009)05-0611-05

壳聚糖在小鼠体内的组织分布与排泄

胡锦涛¹, 张家骥^{*1}, 程沁园², 高娟¹, 夏文水²

(1. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究相对分子质量为50万、脱乙酰度为90%的壳聚糖给小鼠灌胃后在体内的吸收、分布及排泄,为壳聚糖药效学及制剂的开发和利用提供基础数据。用异硫氰酸荧光素对壳聚糖进行标记,产物称为荧光标记的壳聚糖,即FITC-CIS;采用荧光分光光度计测定和HPLC分析相结合的方法,测定小鼠口服FITC-CIS后药物在体内各组织中的分布,并检测给药后24 h内药物从尿和粪中排出的情况。检测方法适用于FITC-CIS在动物体内的药动学研究,实验获得纯化的荧光标记壳聚糖,给小鼠灌胃后壳聚糖在血清中质量浓度非常低,体内主要分布在肾脏中,主要是经粪便排出,粪便中壳聚糖以原形排出,部分分解的壳聚糖从尿液中排泄。

关键词: 壳聚糖; 荧光标记; 组织分布; 排泄

中图分类号: R 969.1

文献标识码: A

Distribution and Excretion of Chitosan in Mice

HU Jin-zhen¹, ZHANG Jia-li^{*1}, CHEN Qin-yuan², GAO Juan¹, XIA Wen-shui²

(1. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to learn the distribution and excretion of chitosan in mice, a fluorescein isothiocyanate labeled chitosan (FITC-CIS) with 5×10^5 of molecular weight and 90% of deacetylation degree was prepared through labeling with fluorescein isothiocyanate and then carefully investigated. It was found that chitosan was mainly distributed in kidney and a very low content in serum, most of FITC-CIS was excreted through feces, and the degraded FITC-CIS was excreted in urine. The results presented here provided the foundation for chitosan as the medicine.

Key words: Chitosan, fluorescein isothiocyanate, distribution, excretion

壳聚糖(chitosan, CIS)是一种可降解吸收的天然高分子材料,由甲壳素经浓碱水解脱去乙酰基后得到。壳聚糖含有游离氨基,能与稀酸结合生成胺盐而溶于稀酸,其安全无毒,具有良好的生物相容

性,在医药、食品、纺织、造纸、化工、环保等领域都具有广阔的应用前景^[1-2]。目前,壳聚糖在医药领域的研究发展非常迅速,越来越多报道表明壳聚糖具有降低胆固醇、降脂^[3]和提高免疫力等多种生理

收稿日期:2008-08-27

基金项目:国家自然科学基金项目(20571034)。

* 通讯作者: 张家骥(1962-),女,江苏宝应人,理学博士,副教授,主要从事天然药物制备及其合成的生物技术研究。Email: 9989card@163.com

活性功能。对壳聚糖药物代谢动力学方面的研究也在逐渐开展,如 Zeng L 等^[4]用 4 种不同相对分子质量的壳聚糖对小鼠灌胃后比较了其在体内的吸收与分布,指出壳聚糖体内吸收的程度与相对分子质量大小和水溶性密切相关;Hiraku Onishi 等^[5]研究了水溶性壳聚糖在小鼠体内的生物降解和分布等。但是对于水不溶性壳聚糖在体内的分布排泄研究报道较少。作者采用异硫氰酸荧光素标记的壳聚糖,观察其给小鼠灌胃后在体内的吸收、分布及排泄情况,为进一步研究壳聚糖药效学及制剂的设计和应用提供基础数据。

1 材料与仪器

1.1 试剂与药品

壳聚糖(脱乙酰度为 90%,相对分子质量为 5×10^5),由江南大学食品学院提供;异硫氰酸荧光素(FITC),购自 Sigma 公司。

1.2 动物

清洁级雌性昆明小鼠,4 周龄,体重 16~20 g,由上海斯莱克实验动物中心提供。动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005。

1.3 仪器

Agilent1100 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司制;VICTOR³TM 1420 型 Multilabel Counter 荧光分光光度计,美国 PerkinElmer 公司制;FD-5 型真空冷冻干燥机,上海市离心机械研究所制;R-110-25-14K 透析袋,上海绿鸟科技有限公司制。

2 实验方法

2.1 FITC 对壳聚糖的标记

壳聚糖溶于 0.1 mol/L 乙酸,配制 1 g/dL 的壳聚糖溶液,1 mol/L NaOH 调节至 pH 9.0,缓慢加入 0.5 倍体积的甲醇,搅拌均匀,加入一定 FITC 脱水甲醇溶液,混匀,25 ℃ 避光搅拌反应 3 h 后,去离子水透析 3 d,至透析袋外的溶液中无荧光吸收,再用过量乙醇清洗标记样品,直至不含游离的荧光素,冷冻干燥。标记的壳聚糖,即 FITC-CIS,用凝胶渗透色谱进行分析检测,测定标记率。壳聚糖与荧光素的反应控制质量比为 60:1。

2.2 色谱分析

2.2.1 除蛋白(乙醇沉淀法) 吸取样品 200 μ L,按体积比 3:1 加入体积分数为 0.90 的乙醇,剧烈振荡 20 min,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,凝胶渗透色谱分析。

2.2.2 凝胶渗透色谱条件 色谱柱 TSK-gel

G3000SW (7.5 mm I.D. $\times$ 60 cm);流动相 0.2 mol/L pH 5.0 乙酸缓冲液(滤膜过滤);体积流量 1.0 mL/min;荧光检测器型号 Agilent1100 型;激发波长(E_x)485 nm,发射波长(E_m)520 nm;柱温 30 ℃;进样量 20 μ L。测定样品为 FITC、FITC-CIS 和粪尿样品。

2.3 动物实验

2.3.1 壳聚糖在小鼠体内的分布 将小鼠随机分为 8 组,每组 8 只。实验前禁食 12 h,自由饮水。按照采样时间将 8 个试验小组设定为 0、0.5、1、2、4、8、12、24 h 组。按照 100 mg/kg 的剂量分别灌胃 10 g/L 壳聚糖溶液,空白组为 0.2 mol/L pH 5.0 乙酸缓冲液。给药后每组按设定的时间摘眼球取血 0.5 mL,置于离心管中,颈椎脱臼处死小鼠,解剖取出心、肝、脾、肺、肾、胃内容物、肠内容物等组织样品。血液和组织样品分别按方法 2.4.1 和方法 2.4.2 进行处理。

2.3.2 壳聚糖小鼠排泄物的测定 取小鼠随机分为 2 组,每组 8 只。试验前置于两个代谢笼内适应 12 h,并禁食,自由饮水。试验组分别按照 50 mg/kg 剂量灌胃壳聚糖溶液,空白组灌胃等量 0.2 mol/L pH 5.0 乙酸缓冲液,分别收集 0~3、3~6、6~9、9~12、12~24 h 各时间段内每只小鼠的尿和粪。再按方法 2.4.3 进行处理。

2.4 生物样品处理

2.4.1 血清样品 3 500 r/min 离心血液 10 min,取上层血清,−20 ℃ 保存备用。

2.4.2 组织样品 完整地取出各组织,用生理盐水洗去表面浮血,吸干称重,各样品取 0.3 g 于封口袋中,置−20 ℃ 保存。测定前取出该组织样品,解冻,剪碎,按预结果将其与一定比例生理盐水混合,制成组织匀浆液。3 500 r/min 离心 10 min,取上清液测定。

2.4.3 粪尿样品 取收集的尿液,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,测定尿液中壳聚糖含量。按每 100 mg 粪加入 1 mL 0.2 mol/L 乙酸缓冲液,匀浆,6 000 r/min 离心 5 min,取上清液,测定其中壳聚糖含量。用 HPLC 检测粪便与尿液中壳聚糖在体内的代谢峰谱。

2.5 样品检测

各吸取 50 μ L 血清、组织匀浆液和粪尿上清样品、PBS(pH 7.4,50 mmol/L)500 μ L,混匀,避光保存,荧光分光光度计测定荧光吸收度。激发波长 485 nm,发射波长 520 nm。

3 实验结果

3.1 FITC 标记壳聚糖

HPLC 测定标记结果如图 1 所示,证明实验纯化得到 FITC-CIS,保留时间为 16.729 min。在 FITC 保留时间处(a)没有峰存在,说明标记过后的产品(b)中无游离荧光素存在。(c)为含游离 FITC 的壳聚糖。

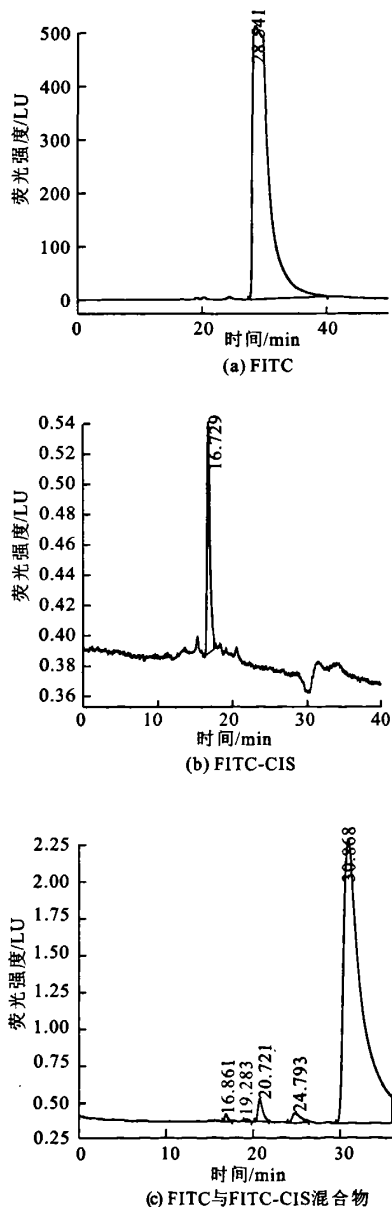


图 1 荧光标记壳聚糖 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of FITC-CIS

3.2 小鼠灌胃壳聚糖体内各脏器组织分布测定

各组小鼠灌胃壳聚糖后按每组所标定的时间,分别摘眼球取血,然后颈椎脱臼处死,取出各组织样品,测定各样品中药物质量分数,结果见图 2。胃内容物和肠内容物测定结果见图 3。

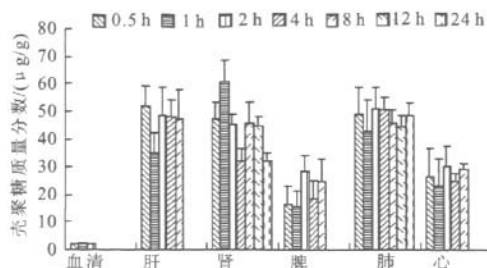


图 2 小鼠灌胃 FITC-CIS 后各时间点和各组织和血清中的药物质量分数

Fig. 2 Concentration in plasma and tissues at different time following gastric infusion of FITC-CIS

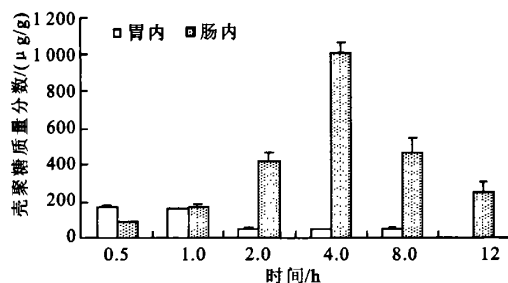


图 3 小鼠灌胃 FITC-CIS 后各时间点和胃内容物和肠内容物中药物质量分数

Fig. 3 Concentration in stomach content and intestine content at different time following gastric infusion of FITC-CIS

3.3 小鼠灌胃壳聚糖排泄测定

FITC-CIS 在尿和粪中的排泄量见表 1,结果表明 FITC-CIS 在口服后 3~6 h 之间排泄浓度达到高峰值,以排泄浓度最大的样品进行 GPC 分析,结果见图 4。

4 讨论

根据文献报道^[6-7],标记率为 1% 左右的壳聚糖对于壳聚糖本身性质影响不大,可用于壳聚糖的功能性研究,故实验中采用的是荧光标记率为 1.21% 的壳聚糖。HPLC 测定标记结果表明,标记的壳聚糖上有多个氨基,标记过程中究竟标哪个氨基是不一定的,有可能多个氨基被标记。不同氨基被标记,出的峰是不一样的。

表 1 小鼠灌胃壳聚糖后各时段尿、粪排泄物中药物含量(n=2)

Tab. 1 Concentration in urine and feces at different time following gastric infusion of FITC-CIS(n=2)

样本测定项目	各时段排泄物中药物含量				
	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
尿中药物 质量浓度/(μg/mL)	33.39±5.41	69.96±3.58	18.54±4.28	19.83±0.32	9.41±1.02
粪中药物 质量分数/(μg/g)	308.47±48.65	1 509.08±76.52	704.02±66.28	64.21±14.80	0

注:FITC-CIS 灌胃剂量均为 50 mg/kg.

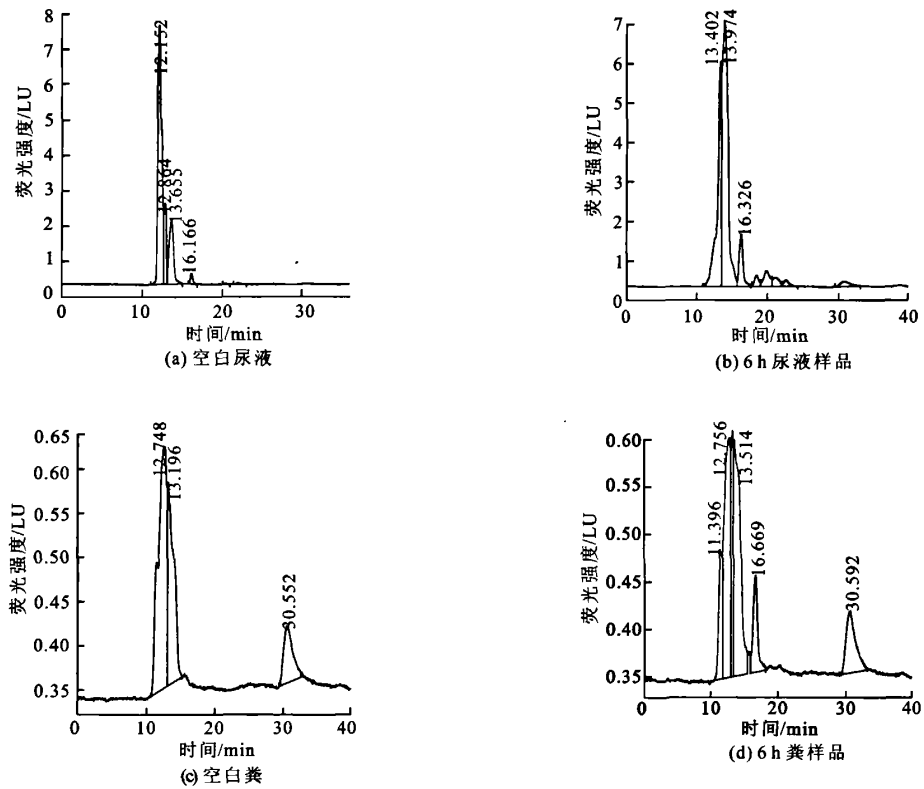


图 4 壳聚糖在小鼠排泄物中的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of FITC-CIS in urine and feces

壳聚糖在各个脏器中存在较高的积累,在心、肝、脾、肺、肾的分布为肾>肝>肺>心>脾。血清中壳聚糖质量分数大大低于在肝脏中的质量分数,这是由于具有高相对分子质量的壳聚糖很难被吸收进入血液中,2 h 后血清中已检测不到荧光吸收,这与血清特殊的迅速清除能力有关^[8]。胃内容物中,0.5 h 时荧光强度最高,8 h 后还有少量壳聚糖的存在,表明壳聚糖在胃中停留时间相对较长。壳聚糖在胃中停留时间的延长可能与其纤维粘滞度高、不易被消化降解的特性有关。壳聚糖的生理活性与它的相对分子质量和水溶性密切相关^[4]。较

高相对分子质量的壳聚糖灌胃后大部分不被吸收,随着肠道 pH 升高,壳聚糖又形成凝胶状,它能够吸附肠道内的脂肪,使其不被吸收,加大粪便中脂肪的排泄,促成了降脂的功效。

小鼠尿液经 HPLC 分析(图 4),结果发现,与空白尿液和 FITC-CIS 图谱相比,灌胃 FITC-CIS 的尿液,在 FITC-CIS 保留时间处没有峰,而推后几分钟,在 18~20 min 处有峰出现,表明尿液中有降解的壳聚糖存在。粪便排泄物中药物质量分数在 3 h 至 6 h 之间达到峰值,随时间的延长,排泄物中药物质量分数逐渐下降。粪便经 HPLC 分析发现,与空

白粪便相比,灌胃 FITC-CIS 的粪便在 16.669 min 处有 FITC-CIS 谱峰,除该峰外,其他的出峰都与空白粪相同,表明 FITC-CIS 未经降解直接以原形从

粪便排出。为准确地研究壳聚糖的药代动力学和进一步分析壳聚糖代谢情况,壳聚糖的荧光标记及其降解物的具体分析将是下一步研究的重点。

参考文献(References):

- [1] 李德鹏,谭绩业,丁仕强,等.壳聚糖溶液性质的研究[J].大连大学学报,2002,23(6):5—8.
LI De-peng, Tan Ji-ye, DING Shi-qiang, et al. The study of chitosan solution properties[J]. *Dalian University of Technology*, 2002, 23(6): 5—8. (in Chinese)
- [2] 吕丹娜,许丽,刘正伟.壳聚糖的生物学作用及在体内代谢的研究进展[J].中国畜牧兽医,2006,33(8):15—18.
KV Dan-na, XU Li, LIU Zheng-wei. Research progress of the biological role of chitosan and metabolism in vivo[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2006, 33(8): 15—18. (in Chinese)
- [3] 沃兴德,洪行球,赵革平,等.壳聚糖对低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢的影响[J].中国药理学通报,2000,16(5):530—533.
WO Xing-de, HONG Xing-qiu, ZHAO Ge-ping, et al. The effects of chitosan to low-density lipoprotein and lipoprotein (a) metabolism[J]. *Chinese Journal of Pharmacology*, 2000, 16(5): 530—533. (in Chinese)
- [4] Zeng L, Qin C, Wang W, et al. Absorption and distribution of chitosan in mice after oral administration[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007(6): 16.
- [5] Hiraku Onishi, Yoshiharu Machida. Biodegradation and distribution of water soluble chitosan in mice[J]. *Biomaterials*, 1999, 20: 175—182.
- [6] Su Young Chae, Jang Mi-Kyeong, Nah Jae-Woon. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans[J]. *Journal of Controlled Release*, 2005, 102: 383—394.
- [7] Kristoffer Tømmeraas, Sabina P Strand, Wei Tian, et al. Preparation and characterisation of fluorescent chitosans using 9-anthraldehyde as fluorophore[J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 336: 291—296.

(责任编辑:秦和平)