

·论著·

N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠的制备、乏氧增敏与体内分布研究

王浩 周则卫 周晓靓

【摘要】目的 在硝基吡唑母核上引入酪氨酸并成盐,制备 N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠并考察其乏氧增敏活性和体内分布情况。**方法** 用缩合剂法合成 N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠,通过小鼠移植瘤模型评价其乏氧增敏活性,通过放射性碘标记法考察其在荷瘤小鼠体内的分布情况。**结果** 合成了目标化合物并对结构进行了确证。移植瘤模型增敏实验表明其对 H₂₂ 移植瘤具有一定的乏氧增敏活性,平均放射增敏比为 1.5。体内分布实验中其在肿瘤部位与脑和肌肉部位的分布比值均大于 5,表明其具有较好的体内分布特性。**结论** N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠具有良好的乏氧增敏活性和体内分布特性,具有进一步开发价值。

【关键词】 N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠;肿瘤;乏氧增敏;体内分布

Synthesis, hypoxic radiosensitization and biodistribution of N-(5-nitroindazole-3-formyl) tyrosine sodium Wang Hao, Zhou Zewei, Zhou Xiaoliang. Tianjin Key laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Zhou Xiaoliang, Email: zhouxiaoliang@irm-cams.ac.cn

【Abstract】 Objective To synthesize N-(5-nitroindazole-3-formyl)tyrosine sodium and investigate its hypoxic radiosensitizing effect and biodistribution. **Method** Synthesized the target compound (N-(5-nitroindazole-3-formyl)tyrosine sodium) using condensing agents, and investigated its radiosensitization under hypoxia using H₂₂ xenograft models and its biodistribution using radioactive iodine labeling. **Results** The synthesis and structure of the target compound were confirmed. Xenograft models showed that it had a certain radiosensitizing activity and the mean value of sensitization enhancement ratio was 1.5. Biodistribution experiment revealed that it had a good distribution manner, the distribution ratios of tumor to the nervous system and muscle were both greater than 5. **Conclusion** N-(5-nitroindazole-3-formyl) tyrosine sodium had good radiosensitizing activity and biodistribution manner, and it was worthy of further study.

【Key words】 N-(5-nitroindazole-3-formyl)tyrosine sodium; Neoplasms; hypoxic radiosensitization; biodistribution

自放射增敏的亲电子理论提出以来,对肿瘤放射增敏药物及其作用机理的研究已有 50 多年的历史^[1-2]。研究最多的是含硝基的亲电子化合物,其中最早开发的亲电子放射增敏剂是咪唑硝唑(misonidazole),它是 2-硝基咪唑类乏氧细胞增敏剂。体外实验研究表明 2-硝基类化合物是硝基咪唑类

中放射增敏作用最强的一类^[3-4]。但几项临床试验研究结果表明咪唑硝唑合并常规放射治疗无明显增敏效果,主要原因是硝基化合物在肿瘤组织中的浓度低,不足以产生明显的增敏效果,该药脂溶性高,能渗透到中枢神经和外周神经组织,导致明显的神经毒性^[5-6]。各国学者对硝基咪唑类化合物进行了大量的减毒增效研究,包括改善药物的脂水分分配系数,根据肿瘤组织特点添加肿瘤特异性基团等,合成了一系列亲电子类乏氧增敏剂。硝基咪唑类化合物也属于亲电子类乏氧增敏剂,具有较好的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.03.010

基金项目:国家自然科学基金(81301983)

作者单位:300192 天津,中国医学科学院放射医学研究所,天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者:周晓靓(Email: zhouxiaoliang@irm-cams.ac.cn)

增敏效果, 但同样具有硝基类化合物的神经毒性, 限制了该类化合物的应用。本研究在硝基吲唑母核上引入酪氨酸合成了 N-(5-硝基吲唑-3-甲酰)酪氨酸钠, 以改善该类化合物的水溶性, 并对该化合物增敏活性进行了初步研究, 同时通过放射性碘标记法考察了其在荷瘤小鼠模型中的分布情况。

1 材料与方方法

1.1 材料与仪器

吲唑-3-羧酸购自常州瑞明药业; L-酪氨酸乙酯盐酸盐购自上海翰宏化工有限公司; 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、1-羟基-苯并-三氮唑购自上海共价化学科技有限公司; 其他试剂均为市售分析纯, 不经纯化直接使用。昆明种小鼠, 雌雄各半, 鼠龄 6~8 周, 体质量 18~22 g, 由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供。可移植性实验肿瘤 H₂₂ 肝癌瘤株由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供。PBS、培养基和胎牛血清等购自 Hyclone 公司。¹³⁷Cs 射线(Gammacell 40, 加拿大 Nordion International Inc.) 照射源, 剂量率为 0.8077 Gy/min。

1.2 N-(5-硝基吲唑-3-甲酰)酪氨酸钠的合成

1.2.1 合成路线

N-(5-硝基吲唑-3-甲酰)酪氨酸钠由起始原料吲唑-3-羧酸经混酸消化后与酪氨酸的酯缩合而成。合成路线如图 1 所示。

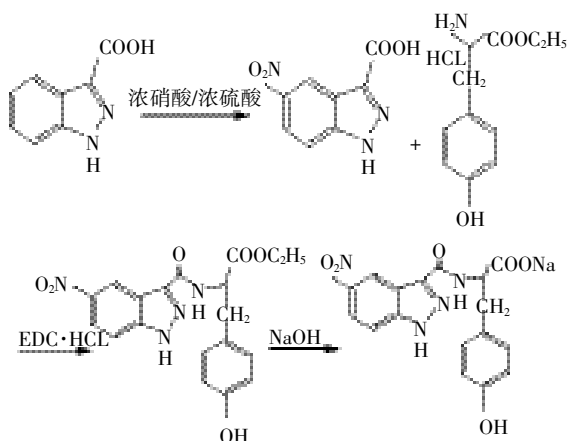


图 1 N-(5-硝基吲唑-3-甲酰)酪氨酸钠的合成路线 图中, EDC·HCl: 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐。

Fig.1 Synthetic route of N-(5-nitroindazole-3-formyl)tyrosine sodium

1.2.2 N-(5-硝基吲唑-3-甲酰)酪氨酸钠的合成过程

100 ml 三口瓶装机械搅拌, 加入 21 ml 发烟硝

酸, 冰盐浴冷却, 滴入 20 ml 浓硫酸 (95%~98%)。滴毕, 分次加入吲唑-3-羧酸 6.7 g (0.05 mol)。整个过程控制温度不超过 0℃。加毕, 室温下搅拌 3 h 后将反应液倾入 200 g 碎冰中, 抽滤收集固体, 干燥, 用 95% 乙醇重结晶, 得白色粉末状固体 (5-硝基吲唑-3-羧酸), 抽滤收集得 6.5 g。收率 74%。熔点 259℃~260℃。

圆底瓶中加入 1.1 g (5 mmol) 5-硝基吲唑-3-羧酸、1.3 g (6 mmol) 酪氨酸乙酯盐酸盐、1.2 g (6 mmol) 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、0.8 g (6 mmol) 1-羟基-苯并-三氮唑和 50 ml 二氯甲烷, 搅拌下滴入 0.9 ml (6 mmol) 三乙胺。室温下搅拌 5 h, 过滤, 滤液依次用蒸馏水 (20 ml×1)、2% 盐酸 (20 ml×3)、0.25% 氢氧化钠水溶液 (20 ml×3)、蒸馏水 (20 ml×3) 洗, 用无水硫酸钠干燥, 蒸干, 加入 10% 氢氧化钠水溶液 10 ml, 室温下搅拌 1 h, 用 5% 盐酸调 pH=3, 析出白色固体 N-(5-硝基吲唑-3-甲酰)酪氨酸, 抽滤收集, 水洗, 所得固体溶于 3 ml 10% 氢氧化钠水溶液中, 向溶液中加入无水乙醇, 抽滤收集固体, 干燥。得土黄色粉末 0.82 g, 即为终产物。收率 42%。熔点 230℃~231℃。

1.2.3 结构确证与含量测定

所得产品经核磁共振氢谱和红外光谱进行鉴定, 并经高效液相色谱法测定含量。

1.3 N-(5-硝基吲唑-3-甲酰)酪氨酸钠对乏氧肿瘤模型的放射增敏作用^[7]

将 H₂₂ 肿瘤细胞悬液 (浓度为 1×10⁷ 个/ml) 注射于小鼠右后脚背侧皮下, 每只小鼠 0.1 ml。瘤体体积达到约 150 mm³ 时随机分组进行实验。将移植瘤小鼠随机分成 4 个大组, 8 个亚组, 每个亚组 8 只。分别为: 乏氧空白对照组 (采用外科动脉夹, 夹住小鼠荷瘤肢体的根部, 阻断小鼠荷瘤肢体血流 10 min)、乏氧给药组 [分为高、中、低 3 个亚剂量组 (200、125、50 mg/kg) 腹腔内单次注射给药]、乏氧照射组 (6 Gy 单次照射)、乏氧照射+给药组 (高、中、低 3 个亚剂量组, 给药后 1 h 乏氧条件下 6 Gy 单次照射)。照射后尽快恢复血液供应。治疗开始后, 用游标卡尺每隔 1 d 测量肿瘤的 3 个直径 a、b、c。按公式 $V = a \times b \times c \times \pi / 6$ 计算肿瘤体积。计算肿瘤体积相对于初始体积的倍数, 绘制肿瘤体积增长倍数对时间的曲线, 计算肿瘤体积增至约实验开始时体积的 3 倍所需时间与乏氧空白对

照组所需时间的差值 (TGD)。药物加照射组的肿瘤生长延迟时间与单纯照射组的肿瘤生长延迟时间之比作为放射增敏比(SER), $SER = TGD_{\text{增敏治疗}} / TGD_{\text{单照射}}$ 。

1.4 N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠在荷瘤小鼠体内的分布^[8-10]

1.4.1 放射性碘标记

5 mg N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠溶解在 25 μl PBS 后, 经 4192 \times g 离心 10 min 取上清液得饱和溶液。取 100 μl 加入 1.5 ml 具塞玻璃标记管中, 加入 4 μl (14.8 MBq) Na^{125}I 混合, 再加入 0.8 mg 氯胺 T (1 mg/100 μl PBS), 室温振荡 5 min, 加入 30 μl 偏亚硫酸钠溶液 (1 mg/100 μl PBS) 终止反应。反应混合物转移到 1 \times 12 cm Sephadex G-75 层析柱上进行分离。用 PBS 洗脱, 每管收集 5 滴, 连续收集 70 管。测量各管的放射性强度, 收集第 32~42 管合并, 约 1.5 ml, 即为标记化合物 ^{125}I -N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠。

1.4.2 ^{125}I -N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠在荷瘤小鼠体内的分布

肿瘤动物模型 12 只, 每只按 0.1 ml/10 g 动物体质量给药。给药后不同时间 (0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h) 分批处死动物, 取血液和各脏器(称重), 测定放射性强度。计算每克组织百分注射剂量率(%ID/g)。

2 结果

2.1 N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠的制备结果

N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠的总收率为 31%。由其红外图谱可知该化合物具有硝基、酰胺基等特征基团。将 N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸做成钠盐与其酸的氢谱对比判断得出, 除羧基氢外其他各氢仍在, 结合红外与核磁共振测试结果可知该化合物结构为 N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠。

以水:甲醇(40:60)为流动相, 1 ml/min, 十八烷基硅烷柱(waters 公司)进行含量测定, N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠出峰时间为 2.5 min, 含量为 97.5%。可以满足后续实验要求。

2.2 N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠的放射增敏作用

根据各组小鼠肿瘤平均体积, 绘制肿瘤生长倍数对时间曲线。N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠的高、中、低剂量组乏氧状态下的肿瘤生长倍数曲线

与乏氧空白对照组肿瘤生长倍数曲线见图 2A, 乏氧状态下, 各治疗组与乏氧照射组的生长倍数曲线见图 2B。

由图 2A 可见单给药各组肿瘤增长倍数曲线与乏氧空白对照组趋势相同, 表明单给药各剂量组对肿瘤生长基本无作用。图 2B 可见各剂量组联合照射后肿瘤增长速度低于空白对照组, 其中单照射与高、中、低剂量联合照射组的 TGD 分别为 6 d、9 d、10 d、8 d。高、中、低 3 个亚剂量组的 SER 值分别为 1.50、1.67、1.33, 平均为 1.50, 表明该药对小鼠 H_2 肿瘤模型具有一定的放射增敏作用。

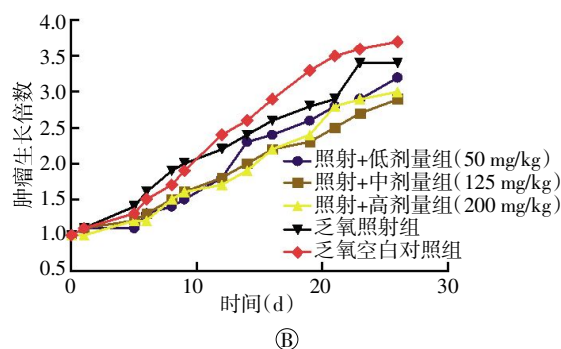
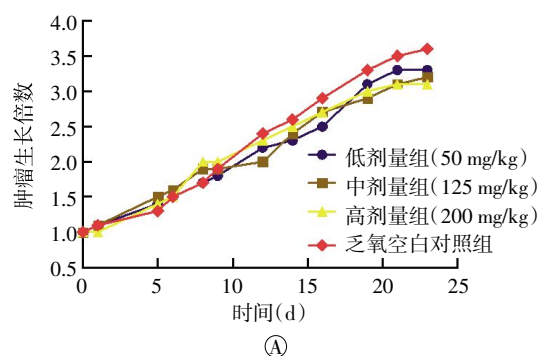


图 2 单给药及联合照射治疗对小鼠肿瘤生长的影响

Fig.2 Effects of drug treatment and drug combined with radiotherapy on tumor xenograft growth in mice

2.3 N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠在荷瘤小鼠体内的分布

2.3.1 放射性标记

N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠与 Na^{125}I 的反应混合物经 Sephadex G-75 层析柱进行分离, 收集 ^{125}I -N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠峰, 所得产物的放射性活度为 5.92 MBq。

2.3.2 标记化合物在荷瘤小鼠体内的分布

由图 3 可见, N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠在肿瘤部位的分布高于脑和肌肉组织, 该化合物肿

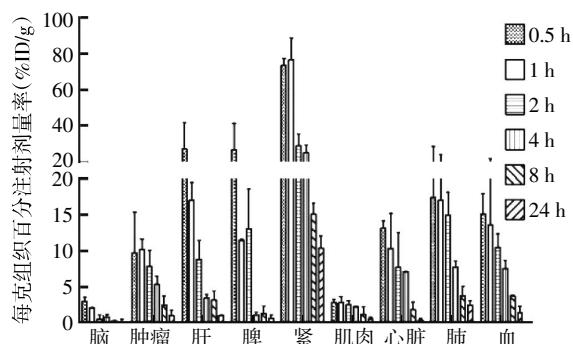


图3 ^{125}I -N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠在荷瘤小鼠体内分布
Fig.3 Biodistribution of ^{125}I -N-(5-nitroindazole-3-formyl)tyrosine sodium in mice bearing neoplasm

瘤与脑和肌肉的分布比皆大于5。正常脏器(肝、脾、肺)中较高的放射性计数可能源于标记化合物的体内脱碘。肾脏的放射性活度高表明该化合物主要经泌尿系统代谢。

3 讨论

硝基吡唑类化合物属亲电子类乏氧增敏剂, 具有较好的放射增敏活性, 但由于该类化合物脂溶性大, 在神经系统分布较高且具有较大的神经毒性, 限制了其在体内的应用。本实验通过在硝基吡唑母核上引入酪氨酸并成盐降低了其脂溶性, 并通过荷瘤小鼠模型考察了其乏氧增敏活性和体内分布特性。通过缩合剂法合成的N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠经红外与核磁共振确定了结构。缩合剂法条件温和, 后处理简单, 合成效率较高, 经重结晶后所得目标化合物具有较高的纯度, 可以满足生物实验的需要。

肿瘤体积增大到一定程度后其内部会形成乏氧区, 乏氧肿瘤细胞对放化疗具有较强的抗性, 是临床放化疗失败和肿瘤复发的原因之一。本实验用荷瘤H₂₂小鼠模型考察了N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠的乏氧增敏活性, 在治疗前阻断荷瘤部位血流模拟临床乏氧条件, 单给药组(高、中、低3个亚剂量组)的肿瘤增长曲线与乏氧空白对照组类似, 肿瘤增长速度与乏氧空白对照组相似, 表明该化合物对肿瘤基本无作用。合并放疗后各给药组的肿瘤增长速度较单照射组相对减缓, 3个亚剂量组肿瘤增长到初始体积3倍的生长延缓时间均低于单照射组, 其平均SER为1.5, 表明该化合物具有一定的

乏氧增敏活性。

N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠含有酪氨酸残基, 可以标记 ^{125}I 进行体内分布研究。本实验通过氯胺T法进行了放射性碘标记, Sephadex G-75柱层析得到了 ^{125}I -N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠, 荷瘤小鼠注射标记化合物后考察了该化合物不同时间点的体内分布情况, 结果表明该化合物主要经泌尿系统代谢, 肿瘤组织在0.5~1 h时有较高的放射性摄取, 肌肉和神经组织的分布小于肿瘤组织。

以上结果可知N-(5-硝基吡唑-3-甲酰)酪氨酸钠易于合成和纯化; 其本身对肿瘤组织无作用, 合并放疗后对肿瘤组织具有一定的乏氧增敏活性, 并且在肿瘤组织中具有较高的摄取, 表明该化合物作为乏氧增敏剂值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 刘华文, 吴敬波. 放射增敏机制的研究进展[J]. 西南军医, 2009, 11(2): 250-252.
- [2] 章鹤, 宋建元, 曹建平. 肿瘤放射增敏药物的研究进展[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2014, 38(6): 408-411.
- [3] 蔡芸, 陈志龙, 赵芳, 等. 硝基咪唑类抗肿瘤放射增敏剂研究进展[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(4): 249-253.
- [4] 叶娟平, 刘韬, 戴昆怡, 等. 放射增敏剂的临床研究进展[J]. 医药导报, 2009, 28(7): 893-896.
- [5] Graziano MJ, Henck JW, Meierhenry EF, et al. Neurotoxicity of misonidazole in rats following intravenous administration[J]. Pharmacol Res, 1996, 33(6): 307-318.
- [6] Sharma R. Nitroimidazole radiopharmaceuticals in hypoxia: part II cytotoxicity and radiosensitization applications[J]. Curr Radiopharm, 2011, 4(4): 379-393.
- [7] 李光, 赵晶, 顾菲, 等. 2-硝基咪唑-吡啶-二乙撑三氮四乙酸对小鼠Lewis肺癌的放射增敏效应[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2006, 15(3): 225-228.
- [8] Sano Y, Motomura T, Yamamoto F, et al. 1-(3'-[^{125}I]iodophenyl)-3-methyl-2-pyrazolin-5-one: preparation, solution stability, and biodistribution in normal mice[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2010, 58(8): 1020-1025.
- [9] Abd Elhalim SM, Ibrahim IT. Radioiodination of 2, 3-dimethyl-4H-furo [3,2-c]coumarin and biological evaluation in solid tumor bearing mice[J]. Appl Radiat Isot, 2014, 95: 153-158.
- [10] 刘鉴峰, 刘金剑, 褚丽萍, 等. ^{125}I 标记聚酰胺-胺及其在小鼠体内的生物分布[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2013, 37(2): 65-68.

(收稿日期: 2015-03-16)