去氨基酪氨酸在大鼠中的药代动力学和安全性评价研究

冯 怡[1#], 张妙娜[2#], 张盛安[3], 朱欣然[1], 于旭华[1], 高晓雯[3], 曾 星[1], 吴 蕾[1*]

(1. 广州中医药大学第二附属医院, 中医证候全国重点实验室, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学科技创新中心, 广东 广州 510405; 3. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 研究去氨基酪氨酸 (desaminotyrosine, DAT) 在SD大鼠中的药代动力学 (pharmacokinetics, PK) 和初步安全性。建立测定DAT体内含量的超高效液相色谱−三重四极杆串联质谱法 (UPLC-MS/MS), 获得大鼠灌胃3个单剂量和多次给药DAT的药动学参数和组织分布特征。评价给药7天的安全性, 如状态、毒性反应和死亡情况、脏体比、血常规、血生化和电解质等指标, 观察脏器病理变化。结果显示, 方法学指标符合生物样品分析要求; DAT在大鼠体内吸收快、消除迅速, PK参数 C_{max} 和 AUC_{0-t} 值按剂量比递增, 且在单、多次给药之间比较无差异; DAT主要分布在肾 > 肝 > 睾丸 > 肺 > 心 > 脾中, 能以极微的量透过血脑屏障。7天给药 ≥ 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} 可引起胃肠道刺激、体重减轻和肝肾损伤。本研究的UPLC-MS/MS分析灵敏、准确和快速, PK参数在单次给药25～125 mg·kg^{-1} 内符合线性药动学特征, 多次给药后未发生蓄积, DAT在50 mg·kg^{-1}·d^{-1} 剂量下安全性良好, 这将为进一步开发其药物价值提供依据。本实验获得广东省中医院实验动物伦理委员会批准 (批准号: 2021042)。

关键词: 去氨基酪氨酸; UPLC-MS/MS; 药代动力学; 安全性

中图分类号: R965 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)10-3222-07

Pharmacokinetics study and safety evaluation of desaminotyrosine in rat

FENG Yi[1#], ZHANG Miao-na[2#], ZHANG Sheng-an[3], ZHU Xin-ran[1], YU Xu-hua[1], GAO Xiao-wen[3], ZENG Xing[1], WU Lei[1*]

(*1. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. The Science and Technology Innovation Centre, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China*)

Abstract: The study aims to investigate the pharmacokinetics (PK) and preliminary safety of desaminotyrosine (DAT) in Sprague-Dawley (SD) rats and establish an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for determining DAT content in blood and tissues, obtaining pharmacokinetic parameters and tissue distribution characteristics of DAT in rats after intragastric administration of three single doses and multiple doses. Evaluate the safety after 7 days of administration, including general condition, toxic reactions and mortality, organ-to-body weight ratios, hematological parameters, blood biochemistry and electrolyte levels, as well as observe pathological changes in organs. The results indicated that the detection methods conformed to the requirements for biological sample analysis. The absorption and elimination of DAT in rats

收稿日期: 2025-01-22; 修回日期: 2025-06-29.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82074343, 82474407); 广州市中医药防治慢性咳喘病研究重点实验室 (2023A03J0226); 广东省基础与应用基础研究基金委员会 (2022A1515220035).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-20-81887233, E-mail: drleiwu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0077

occurred rapidly, with PK parameters such as C_{max} and AUC_{0-t} values increasing in accordance with the dose ratio. No significant differences were observed between single and multiple administrations. DAT was primarily distributed in the kidneys > liver > testes > lungs > heart > spleen, with minimal penetration through the blood-brain barrier. Administration for 7 days at doses ≥100 $mg·kg^{-1}·d^{-1}$ induced gastrointestinal irritation, body weight loss, and liver/kidney injury. The UPLC-MS/MS analysis in the study was sensitive, accurate, and rapid. The PK parameters aligned with a linear PK profile at single doses ranging from 25 to 125 $mg·kg^{-1}$, with no accumulation observed after multiple doses. DAT demonstrated good safety at the dose of 50 $mg·kg^{-1}·d^{-1}$, which will provide a basis for further development of its pharmaceutical value. This experiment was approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (Grant No: 2021042).

Key words: desaminotyrosine; UPLC-MS/MS; pharmacokinetics; safety

去氨基酪氨酸 (desaminotyrosine, DAT) 又名对羟基苯丙酸 (图1), 是一种重要的合成药物和生物活性分子的中间体[1]。已有研究[2-5]报道, DAT作为一种黄酮类化合物的微生物代谢产物具有保护宿主免受流感病毒感染、改善肺免疫调节以及通过免疫检查点抑制剂增强T细胞启动等生物功能。此外, 它还被发现可抑制DSS诱导的结肠炎和LPS引起的炎症反应[6]。然而, 有关DAT的药代动力学 (pharmacokinetics, PK) 特征尚未阐明, 其安全性评价基础也较为薄弱, 目前, 仅有一项研究[7]评估其在Sprague-Dawley (SD) 大鼠中的毒性, 初步确定125 $mg·kg^{-1}$为其安全剂量。因此, 有关DAT的毒性剂量范围及其在体内的PK行为需进一步深入研究。

本文采用SD大鼠进行3个剂量的单次给药试验和高剂量组的多次给药试验, 通过超高效液相色谱–串联质谱联用技术 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 测定经时血药浓度, 首次系统研究DAT在动物体内的PK参数及药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄 (absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME) 特性。同时, 通过大鼠连续给药3个剂量 (bid, 7 d) 的实验, 进一步评价其安全性及药物在组织中的分布特征。本研究旨在为DAT的毒性剂量范围界定和PK机制探索提供关键数据, 为其后续药物研发和临床应用提供更可靠的安全性依据。

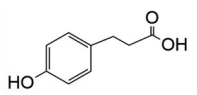


Figure 1　Chemical structure of desaminotyrosine (DAT). MW = 166.18

材料与方法

仪器　SCIEX 6500$^+$ UPLC/Q-Trap质谱系统 (美国SCIEX公司, ESI离子源); Organomation N-EVAP24氮吹仪 (美国Organomation Associates公司); NewClassic MS十万分之一电子天平 (瑞士Mettler Toledo公司); IKA MS3 digital旋涡混合仪 (德国IKA Werke公司); Bend Ruptor 24多样品研磨匀质仪 (美国OMNI公司); Eclipse正置光学显微镜 (日本尼康公司); BC-5390全自动五分类血液细胞分析仪 (中国迈瑞公司) 及配套试剂盒; Cobas C 702全自动生化分析仪 (美国罗氏公司) 及配套试剂盒。

药品和试剂　去氨基酪氨酸 (批号: 29868) 购自美国MedChemExpress公司 (纯度: HPLC ≥ 98%); 4-羟基苯乙酸 (批号: D218C7H6D6) 购自中国ChemTown Technology公司 (纯度: HPLC ≥ 98%); 甲醇、乙腈和甲酸 (均为色谱纯) 购自美国Fisher Scientific公司; 4%组织固定液 (货号: JX0100) 购自中国晶欣生物科技有限公司; 苏木精–伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色试剂盒 (批号: C0105S) 购自中国碧云天生物技术有限公司; 实验用水为本实验室超纯水机制备。

实验动物　12～15周龄健康SD雄性大鼠 (300 ± 20 g, SPF级) 56只, 购于广东维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证: SCXK-(粤) 2022-0063。本实验获得广东省中医院实验动物伦理委员会批准 (批准号: 2021042)。实验前大鼠适应性喂养1周, 禁食12 h, 自由饮水。屏障环境、温度为23～26 ℃, 相对湿度为45%～65%, 昼夜各半循环照明。

UPLC/MS-MS条件　以Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱、0.002 5%甲酸–乙腈流动相进行梯度洗脱和分离, 采用多反应监测 (multiple reactionmonitoring, MRM) 负离子模式定量: DAT *m*/*z* 165.0→59.0, 内标物 *m*/*z* 151.0→79.0。

血样和组织处理　取25 μL血清/各组织匀浆液加入4-羟基苯乙酸内标工作液10 μL (100 $μg·mL^{-1}$), 以150 μL乙腈 (含2 $mol·L^{-1}$ HCl) 涡旋提取, 上清液经氮气吹干, 加入750 μL 50%甲醇复溶, 高速离心后取上清液检测。

分析方法验证实验 考察生物样品DAT检测法的特异性、定量范围和标准曲线、精密度和准确度、残留、稀释可靠性、样品稳定性、血和各组织匀浆液的基质效应等指标[8,9]。

PK研究和数据处理 大鼠分4组分别灌胃DAT水溶液 (n = 8): 单次给药25、50、125 mg·kg^{-1}, qd和连续7天125 mg·kg^{-1}·d^{-1}给药, 各单次组和多次组第7天于灌胃前15 min及灌胃后10、20、30、45 min和1、1.5、2、3、4、6、8、12 h采眼眶静脉丛血, 多次组的第1、4、5、6天采集灌胃前15 min和灌胃后20 min血样, 离心分离得血清[10]。称取安全性评价实验的100、250 mg·kg^{-1}剂量组解剖的各组织约200 mg, 加入3倍量生理盐水和磁珠在匀质仪中匀浆, 离心分离得匀浆液。均按“血样和组织处理”操作后测定DAT浓度。

血药浓度数据使用WinNonlin 8.1 (Pharsight Corporation, USA)处理, 以非房室模型法拟合药−时曲线和计算PK参数, 其中达峰时间t_{max}和最大血药浓度C_{max}采用实测值, 药−时曲线下面积AUC采用梯形法计算, 消除半衰期$t_{1/2}$根据末端消除相计算。数据以$\bar{x} \pm s$表示。采用SPSS11.0软件评价线性动力学特征和蓄积情况, 测定组织匀浆液DAT浓度后折算得各脏器中含量, 采用Excell软件绘制DAT药−时曲线图。

安全性评价和数据处理 大鼠分为4组 (n = 6), 空白组 (无菌水灌胃) 和DAT低、中、高剂量组 (25、50、125 mg·kg^{-1}, bid, 相隔12 h给药1次, 即50、100、250 mg·kg^{-1}·d^{-1}), 连续7天。观察各组毒性反应和死亡情况, 最后一次给药30 min后解剖取肝、心、脾、肺、肾、脑和睾丸, 称重后计算各脏器质量和脏体比, 使用全自动五分类血液细胞分析仪检测血常规指标, 全自动生化分析仪检测血生化及电解质等指标, 应用HE染色法观察组织切片的病理变化。数据以$\bar{x} \pm s$表示, 进行单因素或双向方差分析 (ANOVA), 对多重比较进行Dunnett's检验, P < 0.05视为差异有统计学意义。应用Graphpad Prism (9.0版) 软件统计分析数据。

结果

1 分析方法学验证

1.1 特异性 以血样为代表, 空白血、空白血加DAT及内标、给药后血样的多反应监测色谱MRM色谱见图2, DAT和内标的保留时间t_R分别为4.54、3.63 min, 内源性物质不干扰测定。

1.2 标准曲线和定量范围 于空白组大鼠血清中加入DAT标准系列溶液, 配制浓度为0.1、0.3、1、3、10、30、100、250、300 μg·mL^{-1}的标准曲线血样, 按“血样和组织处理”项操作后分析, 计算DAT与内标峰面积比得回归方程, 代表性方程为: Y = 0.000 172 C − 0.002 39, r = 0.997 8, 权重1/X^2。血样中DAT在0.1～300 μg·L^{-1}内线性关系良好; 在300 μg·mL^{-1}后的定量上限 (ULOQ)测定空白血样, 未测出分析物峰, 残留考察合格。

1.3 精密度与相对回收率 配制0.3、10、125、250 μg·mL^{-1} 4个浓度的质控血样和0.1 μg·mL^{-1}定量下限血样、同法操作后分析 (n = 5), 连续测定3 d, 结果显示, 批内相对标准偏差 (RSD)在2.49%～11.12%, 批间RSD在5.75%～9.50%; 平均相对回收率96.84%～111.10%; 定量下限 (LLOQ)为0.1 μg·mL^{-1}, RSD和相对回收率分别为4.31%、98.32%。

1.4 基质效应和提取回收率 以大鼠空白血清配制浓度为0.3、125、250 μg·mL^{-1}质控血样 (n = 5), 以血样标准曲线测定得准确度即为基质效应[9]: 106.90%、108.05%和107.62%, 其色谱峰面积记为B组; 另外配制3个相等浓度的DAT工作液, 将空白大鼠血处理至氮气吹

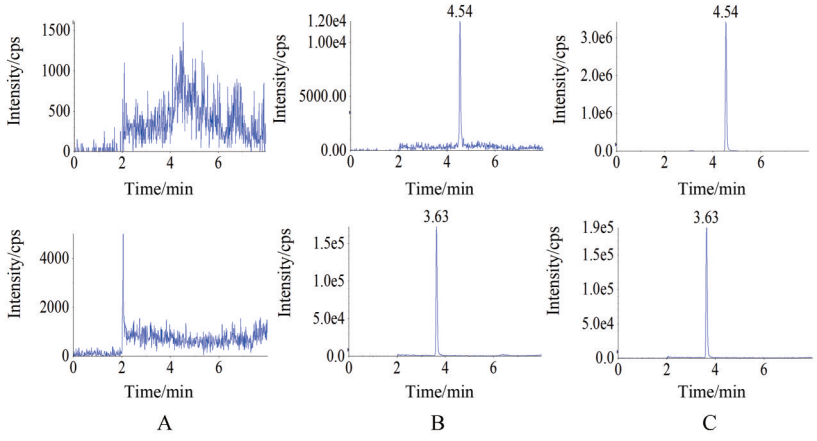


Figure 2 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatogram of DAT (4.54 min) and internal standard (3.63 min) in rat serum by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). A: Blank serum; B: Blank serum spiked with DAT (0.1 μg·mL^{-1}) and internal standard; C: Serum sample collected after oral administration of DAT (50 mg·kg^{-1})

干, 加入此工作液 750 μL 测定得 A 组 (n = 5), 以色谱峰面积 B/A 计算得提取回收率为: 82.75%、87.40% 和 88.99%。用空白组大鼠的 7 种组织匀浆液基质分别配制 1、25 μg·mL^{-1} 样本 (n = 3), 以随行血样标准曲线测定得相对回收率为: 心 (97.20% 和 97.53%)、肝 (92.63% 和 97.30%)、脾 (91.57% 和 93.63%)、肺 (95.70% 和 97.47%)、肾 (98.07% 和 98.43%)、脑 (87.43% 和 93.37%)、睾丸 (94.37% 和 95.97%), 结果表明: 可以血清作为替代基质、以其标准曲线对各组织匀浆液定量。

1.5　稳定性　取 0.3、250 μg·mL^{-1} 质控血样 (n = 5), 分别在室温放置 6 h、经 3 次反复冻融和 −75 ℃保存 3 个月, 同法制备后分析, 待测液在自动进样器 8 ℃放置 48 h 后测定, 相对回收率都在 87.60%～111.51% 内, DAT 在上述条件下保持稳定。

2　药代动力学特征

大鼠单、多次给药的药−时曲线见图 3。结果显示, 给药后血药浓度在 10～30 min 快速达峰, 半衰期较短, 25、50 mg·kg^{-1} 组在 6 h 浓度已下降至 < 0.3% C_{max}, 其后已低于定量下限, 125 mg·kg^{-1} 组在 12 h 浓度已下降至 < 0.15% C_{max}; 3 个组的 C_{max} 按剂量成比例增加, 多次给药 125 mg·kg^{-1} 组的第 1、4、5、6、7 天的稳态峰浓度水平接近, 谷浓度低于定量下限。

大鼠主要 PK 参数见表 1。统计结果显示, 3 个单剂量组间的 C_{max}、$AUC_{0\text{-}t}$ 经剂量校正和对数转换后进行 90% 置信区间分析, 结果在 90.21%～109.79% 和 94.08%～105.92% 内, 表明 DAT 在 25～125 mg·kg^{-1} 的体内暴露量与剂量成正比, 清除率 (CL) 接近 (t 检验差异无显著性, P > 0.05), 符合线性动力学特征。而中、低剂量组 $t_{1/2}$ 接近, 但与 125 mg·kg^{-1} 组有较大差异, 这与 50 mg·kg^{-1} 组在 6 h 后的血药浓度过低有关。对单、多次给药 125 mg·kg^{-1} 组的 C_{max} 和 $AUC_{0\text{-}t}$ 进行同法比较, 其 90% 置信区间在 91.15%～100.85% 和 97.37%～102.63% 内, 其 $t_{1/2}$ 和 CL 接近 (t 检验差异无显著性, P > 0.05), 药−时曲线特征相近, 这表明多次给药后 PK 特征无变化, 而且 DAT 的平均驻留时间 ($MRT_{0\text{-}t}$) < 1 h, 提示体内不易发生蓄积。表观分布容积 (V) 数据表明药物在体内各组织中有一定分布。

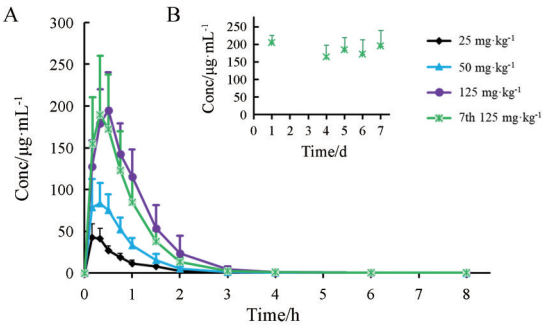


Figure 3　Mean serum concentration-time profiles of DAT after oral administration in rats (n = 8, $\bar{x} \pm s$). A: Three single-dose and 7th multiple-dose; B: Multiple-dose

3　DAT 的组织分布

DAT 在各组织中的含量见表 2。结果表明: DAT 在主要代谢器官肾脏和肝脏中的分布浓度最高, 同时在睾丸、心脏、肺和脾脏中也有广泛分布。在 100 与 250 mg·kg^{-1}·d^{-1} 组中, DAT 的组织分布个体差异大、未呈现显著的剂量依赖性, 这可能与其在不同组织中的代谢动力学特性或组织特异性摄取机制有关。此外, 在部分大鼠的脑组织中检测到了微量 DAT 成分, 提示其可能具有一定的血脑屏障穿透能力。

4　安全性评价

4.1　对大鼠的生理情况及体重的影响　在实验期间, 各组大鼠均未观察到明显的中毒症状或死亡现象。如图 4 所示, 正常对照组大鼠的体重呈现持续增长趋势, 而 50、100 mg·kg^{-1} 组大鼠在前 5 天体重增长较快, 随后增长趋势减缓。相比之下, 250 mg·kg^{-1} 组大鼠的体重显著下降。在摄食量方面, 50、100 mg·kg^{-1} 组大鼠的摄食行为基本正常, 但 100 mg·kg^{-1} 组从第 5 天起摄食量呈下降趋势, 250 mg·kg^{-1} 组摄食量则显著减少。上述结果表明, DAT 对大鼠体重增长和摄食行为具有剂量依赖性抑制作用。

4.2　对脏体比的影响　相对器官重量 (脏体比) 的显著变化是评估化合物毒性的重要指标之一。如图 5 所示,

Table 1　PK parameters of DAT after single and multiple oral dosing in rats (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Single dose			Multiple dose 7th,
	25 mg·kg^{-1}	50 mg·kg^{-1}	125 mg·kg^{-1}	125 mg·kg^{-1}
t_{max}/h	0.23 ± 0.12	0.33 ± 0.09	0.49 ± 0.13	0.33 ± 0.00
$t_{1/2}$/h	0.62 ± 0.25	0.64 ± 0.32	2.62 ± 1.02	2.17 ± 0.88
CL/L·h^{-1}	718.48 ± 127.60	630.13 ± 110.29	609.45 ± 224.59	686.36 ± 156.83
V/L	659.83 ± 326.43	581.37 ± 311.80	2 438.78 ±1 594.80	2 111.82 ± 885.50
$AUC_{0\text{-}t}$/μg·L^{-1}·h	35.70 ± 7.06	81.62 ± 16.17	223.86 ± 64.63	190.75 ± 48.36
$AUC_{0\text{-}\infty}$/μg·L^{-1}·h	35.88 ± 7.03	81.78 ± 16.13	224.74 ± 64.40	191.50 ± 48.50
$MRT_{0\text{-}t}$/h	0.82 ± 0.19	0.79 ± 0.21	0.95 ± 0.14	0.83 ± 0.12
$MRT_{0\text{-}\infty}$/h	0.85 ± 0.20	0.81 ± 0.22	1.01 ± 0.12	0.88 ± 0.13
C_{max}/μg·L^{-1}	46.55 ± 14.86	92.00 ± 33.52	201.79 ± 46.44	189.67 ± 17.66

Table 2 Mean tissue distribution of DAT following multiple oral administrations in rats (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Tissue	100 mg·kg^{-1}·d^{-1}	250 mg·kg^{-1}·d^{-1}
Lung	4.93 ± 5.19	3.31 ± 3.27
Liver	59.42 ± 78.96	55.88 ± 54.08
Heart	3.88 ± 4.55	3.43 ± 3.31
Spleen	3.43 ± 4.96	2.36 ± 2.34
Kidney	129.99 ± 84.30	210.85 ± 194.55
Testis	9.49 ± 6.57	20.44 ± 16.55

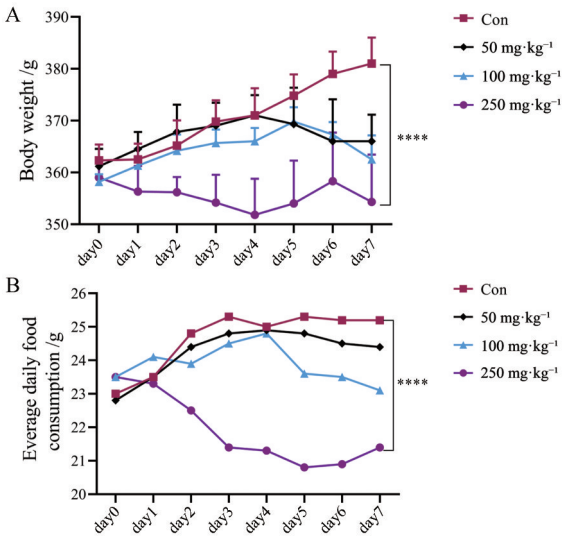


Figure 4 Weight gain and food consumption of rats in acute toxicity experiments of DAT following multiple oral administrations. A: Body weight changes; B: Food intake. n = 6, $\bar{x} \pm s$. $^{****}P$ < 0.000 1 *vs* control group

在毒性试验中, 50 mg·kg^{-1}组与正常对照组之间的脏体比无显著性差异。100 mg·kg^{-1}组SD大鼠的相对肝重量显著增加。250 mg·kg^{-1}组表现出更强的毒性作用, 显著增加了相对肝重量、相对肾重量和相对睾丸重量。各剂量DAT对肺、心、脾脏重量均未产生明显影响。这些结果表明, DAT可能主要作用于肝脏、肾脏和睾丸, 这与其在这些组织中的高分布水平一致。此外, 100、250 mg·kg^{-1}组的肝脏重量及肝脏脏体比显著升高, 且呈现剂量依赖性, 提示DAT可能具有一定的肝毒性。

4.3 对血液指标的影响 大鼠的主要血液学指标列于表3。与空白对照组相比, 50 mg·kg^{-1}组的血液学参数未观察到显著变化。在100 mg·kg^{-1}组中, 白细胞计数显著升高, 而淋巴细胞百分比、单核细胞百分比和平均红细胞血红蛋白量显著降低。在250 mg·kg^{-1}组中, 白细胞计数和中性粒细胞百分比显著升高, 同时淋巴细胞百分比、红细胞计数、血红蛋白浓度和红细胞比积均显著下降。而3组不同剂量的DAT对大鼠平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白量、平均红细胞血红蛋白浓度、红细胞分布宽度、血小板计数、平均血小板体积、血小板压积、血小板分布宽度均没有表现出显著影响。这些结果表明, 50 mg·kg^{-1}剂量对血液学参数无明显影响, 而100、250 mg·kg^{-1}剂量对血液学参数的影响呈现剂量依赖性, 其中250 mg·kg^{-1}剂量可能具有明显的血液学毒性作用。

4.4 血液生化及电解质指标影响 大鼠的血液生化及电解质指标列于表4。在血液生化指标分析中, 50 mg·kg^{-1}组与空白对照组相比, 各指标均未观察到显著差异。在250 mg·kg^{-1}组中, 肌酐、钾、钠和氯离子水平显著升高, 而总二氧化碳水平显著降低。在高剂量组中, 谷丙转氨酶、谷草转氨酶、尿素、肌酐、甘油三酯、钾、钠和氯离子水平均显著升高, 同时总二氧化碳水平显

Table 3 Effect of DAT to hematological index in rats. WBC: White blood cell; NEU: Neutrophil count; LYM: Lymphocyte; MONO: Monocyte; RBC: Red blood cell; Hb: Hemoglobin; HCT: Hematocrit; MCV: Mean corpusular volume; MCH: Mean corpusular hemoglobin; MCHC: Mean corpusular hemoglobin concerntration; RDW: Red blood cell volume distribution width; PLT: Platelet count; MPV: Mean platelet volume; PCT: Plateletocrit; PDW: Platelet distribution width. n = 6, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P$ < 0.05, $^{**}P$ < 0.01, $^{***}P$ < 0.001, $^{****}P$ < 0.000 1 *vs* control group

Hematological parameter	Con	50 mg·kg^{-1}	100 mg·kg^{-1}	250 mg·kg^{-1}
WBC/10^{9}·L^{-1}	5.26 ± 0.16	5.55 ± 0.31	5.91 ± 0.40*	6.31 ± 0.62***
NEU/%	30.32 ± 1.24	35.83 ± 2.55	35.65 ± 1.13	46.98 ± 10.19****
LYM/%	62.27 ± 2.22	57.93 ± 3.43	59.85 ± 1.17*	46.62 ± 10.69***
MONO/%	6.35 ± 1.48	5.35 ± 0.35	4.20 ± 1.46**	5.57 ± 1.54
RBC/10^{12}·L^{-1}	142.50 ± 0.36	140.00 ± 0.59	130.70 ± 0.21	119.20 ± 1.12**
Hb/g·L^{-1}	7.08 ± 4.55	6.86 ± 9.80	6.84 ± 4.23	5.88 ± 25.65*
HCT/%	40.53 ± 1.11	40.75 ± 3.45	37.70 ± 0.98	33.38 ± 6.52**
MCV/fL	57.35 ± 2.54	57.28 ± 2.61	55.42 ± 0.91	57.03 ± 1.87
MCH/pg	20.17 ± 0.87	19.67 ± 0.55	19.18 ± 0.34*	20.30 ± 0.40
MCHC/g·L^{-1}	351.30 ± 3.50	343.80 ± 6.94	346.50 ± 3.83	355.50 ± 9.16
RDW/%	13.58 ± 0.31	12.88 ± 0.33	13.58 ± 0.39	13.65 ± 0.80
PLT/10^{9}·L^{-1}	1 004.00 ± 114.40	1 037.00 ± 73.11	1 022.00 ± 74.01	885.70 ± 103.80
MPV/fL	7.20 ± 0.59	6.85 ± 0.35	6.85 ± 0.37	7.03 ± 0.60
PCT/%	0.72 ± 0.06	0.71 ± 0.03	0.70 ± 0.03	0.63 ± 0.11
PDWA/fL	15.12 ± 0.15	15.03 ± 0.20	15.08 ± 0.13	14.97 ± 0.08

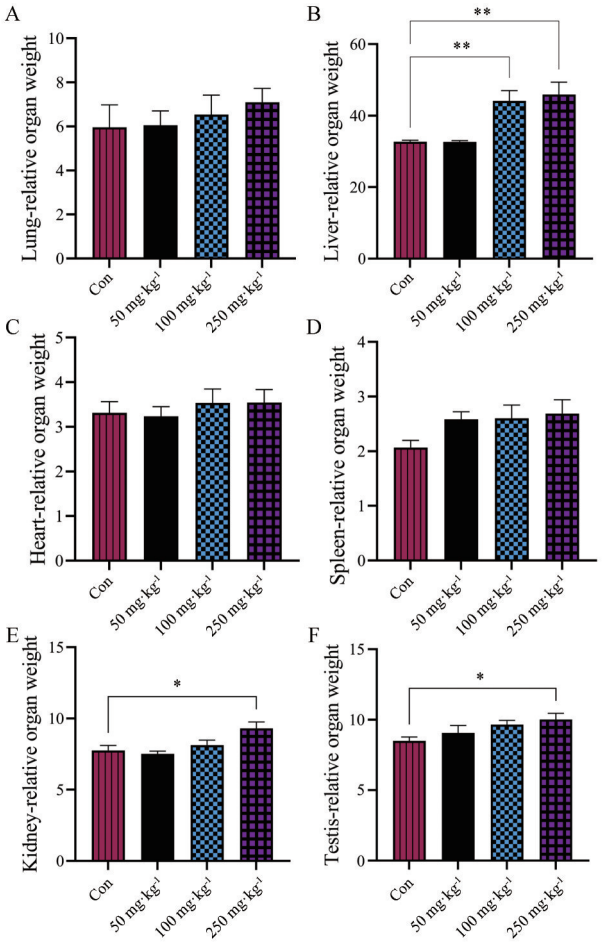


Figure 5　Relative organ weight of rat tissue (viscera/body ratio, mg·g^{-1}). A: Lung; B: Liver; C: Heart; D: Spleen; E: Kidney; F: Testis. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

著降低。而各剂量DAT对钙离子及磷离子均未见影响。这些结果表明, 50 mg·kg^{-1}组对血液生化指标无明显影响, 而100、250 mg·kg^{-1}组对肝功能和肾功能相关指标的影响呈现剂量依赖性, 其中250 mg·kg^{-1}组可能具有显著的肝毒性和肾毒性, 这与脏体比的结果一致。

4.5　病理变化　在实验结束时, 对每组大鼠的主要脏器肺、肝、心、脾、肾、睾丸、脑进行解剖观察, 肉眼未见明显异常。随后, 随机选取每组大鼠的脏器组织 ($n = 6$) 进行石蜡包埋、切片及HE染色。在低倍镜 (10×) 下, 随机选择5～10个视野进行初步观察, 确保覆盖组织的不同区域如中央区和周边区。根据脏器的组织学特点, 选择具有代表性的区域进行高倍镜 (40×) 观察, 评估每个视野的病理改变。例如, 肝小叶结构、中央静脉周围及门管区, 肾小球、肾小管及间质区域, 肺泡结构、支气管及血管周围区域。结果显示, 脾脏、睾丸、心脏和脑组织的病理切片与空白对照组相比未见明显异常。由于肝脏和肾脏是代谢的主要器官, 且肺部据报道与DAT的免疫调节作用相关, 因此对肝、肾、肺组织进行了重点观察。如图6所示, 50 mg·kg^{-1}组和100 mg·kg^{-1}组的肺、肝、肾组织病理切片均未观察到显著病理改变。然而, 在250 mg·kg^{-1}组中, 肺组织切片显示气管及血管周围有明显的炎性细胞浸润, 肺泡隔结构消失, 肺泡壁增厚, 提示DAT可能通过增加免疫吞噬细胞的浸润而诱导肺部炎症反应; 肝脏病理切片显示肝脂肪变性, 胞质内出现微小圆形空泡, 肝细胞轻度水肿变性, 胞质疏松淡染, 提示DAT可能具有潜在的肝毒性; 肾脏病理切片显示肾小球体积增大, 系膜基质轻度增生, 肾小管轻度水肿, 但肾间质未见明显炎症细胞浸润, 提示DAT可能对肾脏功能产生一定影响。结果表明, 50 mg·kg^{-1}组对主要脏器无明显病理影响, 而250 mg·kg^{-1}组可能诱导肺、肝、肾组织的病理改变, 且其毒性作用呈现剂量依赖性。

讨论

本研究应用液–质联用技术建立了特异性强、灵敏、快速的去氨基酪氨酸体内检测方法。DAT分子量小, 以MRM离子对 m/z 165.0→59.0进行定量可避免其他小分子物质干扰, 选择结构相似的内标物很好地校正了误差。大鼠采血少、仅需25 μL血清和组织液制样。

Table 4　Effect of DAT on biochemical and electrolyte blood data rats. ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; Cr: Creatinine; TCO_2: Total carbon dioxide; TG: Triglyceride. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control group

Serum biochemistry	Con	50 mg·kg^{-1}	100 mg·kg^{-1}	250 mg·kg^{-1}
ALT/U·L^{-1}	40.33 ± 6.68	46.83 ± 8.32	46.83 ± 6.68	54.00 ± 8.32**
AST/U·L^{-1}	142.00 ± 12.87	148.30 ± 16.17	179.30 ± 50.78	199.20 ± 35.70*
AST/ALT	3.53 ± 0.43	3.58 ± 0.57	3.27 ± 0.98	3.78 ± 1.03
Urea/mol·L^{-1}	5.32 ± 0.43	5.47 ± 0.63	5.70 ± 0.88	6.67 ± 0.65**
Cr/μmol·L^{-1}	23.50 ± 1.23	26.33 ± 1.63	29.17 ± 3.31**	29.50 ± 3.27**
TCO_2/mmol·L^{-1}	26.08 ± 1.52	24.95 ± 2.30	22.27 ± 1.45**	20.95 ± 1.27***
TG/mmol·L^{-1}	0.38 ± 0.07	0.35 ± 0.06	0.48 ± 0.13	0.60 ± 0.13**
K^{+}/mmol·L^{-1}	5.38 ± 0.19	5.83 ± 0.40	6.19 ± 0.42**	6.10 ± 0.39**
Na^{+}/mmol·L^{-1}	138.30 ± 1.03	140.30 ± 1.63	143.30 ± 1.51****	143.30 ± 1.21****
CL^{-}/mmol·L^{-1}	98.85 ± 0.96	98.93 ± 0.77	103.90 ± 1.66****	104.80 ± 1.01****
Ca^{2+}/mmol·L^{-1}	2.43 ± 0.08	2.44 ± 0.08	2.43 ± 0.07	2.39 ± 0.06
P^{+}/mmol·L^{-1}	2.78 ± 0.17	2.66 ± 0.16	2.83 ± 0.19	2.59 ± 0.21

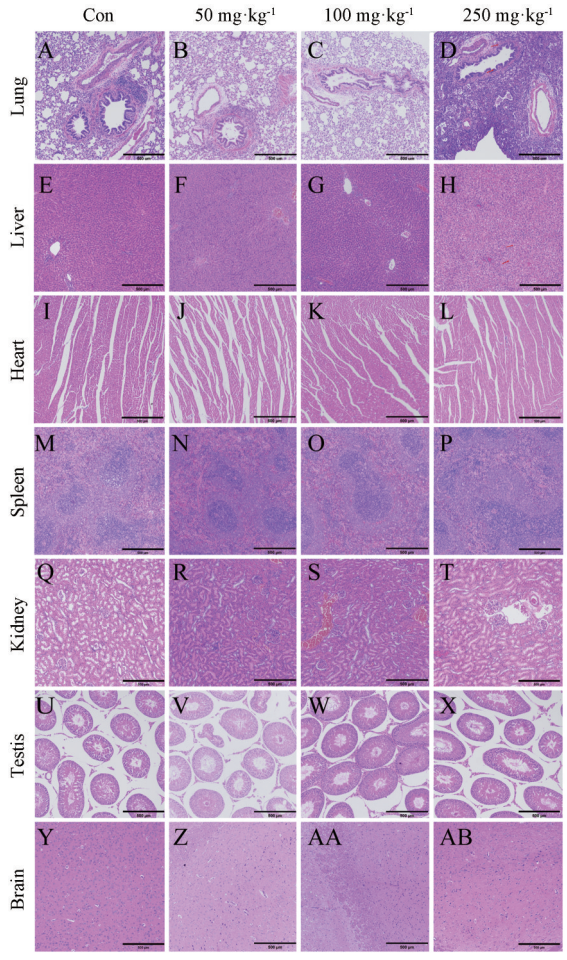


Figure 6 Histopathological examination of the organizations in 4 groups of SD rats treated with DAT for 7 days. A−D: Lung; E−H: Liver; I−L: Heart; M−P: Spleen; Q−T: Kidney; U−X: Testis; Y, Z, AA and AB: Brain. Scale bar: 500 μm

本文探索了DAT的动物药代动力学, 发现其在大鼠体内吸收快、消除迅速, 药−时曲线呈现经典口服药物特性, 在25～125 mg·kg^{-1}剂量内符合线性动力学特征, 多天给药的C_{max}水平稳定, 药物不发生蓄积。而DAT在肾、肝中的分布高, 可能以极微的量透过血脑屏障。一项研究[7]显示SD大鼠以175 mg·kg^{-1}分别灌胃2天和14天没有明显急性毒性症状, 给药125 mg·kg^{-1}剂量30天没有观察到亚慢性毒性, 但在250和500 mg·kg^{-1}剂量则对食物摄入、肝脏、肾脏和肺部表现出明显毒性。本研究获得DAT的安全剂量为50 mg·kg^{-1}·d^{-1}, 低于上述研究, 以100 mg·kg^{-1}剂量连续灌胃7天有轻度的肝肾功能等指标异常和开始影响食物摄入, 250 mg·kg^{-1}剂量也存在明显的肝肾毒性, 且呈剂量依赖型递增, 过高剂量的DAT引起的影响可能是胃肠道刺激、体重减轻和肝肾损伤。在有关DAT可增加I型干扰素表达的一项重要研究中[2], 小鼠连续7天饮用DAT水溶液约10 mg·kg^{-1}可起效。因此, 本研究选取了文中剂量开展各项实验, 填补了去氨基酪氨酸的体内药动学研究的空白, 进一步开展毒性和安全性评价, 为深入研究其作用机制提供数据。

作者贡献: 冯怡负责项目设计、实施及文章撰写; 张妙娜负责毒性评价和数据处理; 张盛安负责药动学数据处理; 朱欣然和高晓雯协助完成动物实验; 曾星和于旭华协助指导实验和统计; 吴蕾负责获取经费资助并指导整个实验。所有作者都阅读并认可手稿的最终版。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

[1] Zhuo JL, Carretero OA, Peng H, et al. Characterization and localization of Ac-SDKP receptor binding sites using ^{125}I-labeled Hpp-Aca-SDKP in rat cardiac fibroblasts [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292: H984-H993.

[2] Steed AL, Christophi GP, Kaiko GE, et al. The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon [J]. Science, 2017, 357: 498-502.

[3] Saura-Calixto F, Perez-Jimenez J, Tourino S, et al. Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from *in vitro* colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma [J]. Mol Nutr Food Res, 2010, 54: 939-946.

[4] Lambert MA, Moss CW. Production of *p*-hydroxyhydrocinnamic acid from tyrosine by *Peptostreptococcus anaerobius* [J]. J Clin Microbiol, 1980, 12: 291-293.

[5] Dodd D, Spitzer MH, Van Treuren W, et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites [J]. Nature, 2017, 551: 648-652.

[6] Zhang B, Zhang Y, Liu X, et al. Distinctive anti-inflammatory effects of resveratrol, dihydroresveratrol, and 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid on DSS-induced colitis in pseudo-germ-free mice [J]. Food Chem, 2023, 400: 133904.

[7] Li F, Wang L, Cai Y, et al. Safety assessment of desaminotyrosine: acute, subchronic oral toxicity, and its effects on intestinal microbiota in rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2021, 417: 115464.

[8] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol IV. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 466.

[9] Timmerman P, Barfield M, Cowan K, et al. Conference report from the European bioanalysis forum workshop: toward harmonized implementation of the ICH M10 guideline [J]. Bioanalysis, 2022, 14: 1407-1411.

[10] Wang G, Wang X, Xiao C, et al. Determination of paclitaxel prodrug in SD rat plasma by LC-MS/MS and its application in preclinical pharmacokinetic studies [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 2798-2804.