

犬肝动脉栓塞阿霉素脂质体药动学研究

朴相浩 王执民 徐山波 张国民 徐金龙 关彦 张玻

摘要: 以高效液相色谱法研究了阿霉素(ADM)脂质体-碘油犬肝动脉栓塞(Ⅲ)后 ADM 的体内靶向性特征和药代动力学,并分别与肝动脉 ADM 溶液灌注组(Ⅰ)和肝动脉 ADM-碘油栓塞组(Ⅱ)做了平行比较,实验结果:与(Ⅰ)组相比,(Ⅲ)组外周静脉中 ADM 浓度非常显著降低($P<0.01$)而 ADM 的半衰期和肝组织中的浓度则非常显著增加($P<0.01$);与(Ⅱ)组相比,(Ⅲ)组外周静脉血中 ADM 浓度显著降低($P<0.05$),而消除半衰期和肝组织中 ADM 浓度均显著增加($P<0.05$)。结论:ADM 脂质体与碘油混合肝动脉栓塞可显著提高 ADM 对肝脏的靶向性,延长 ADM 消除半衰期,并因降低外周血浆中 ADM 的浓度而减少了 ADM 对心脏及其它器官的毒副作用。

关键词: 阿霉素 阿霉素脂质体 肝动脉栓塞 药代动力学 高效液相色谱法

A Study of Pharmacokinetics of Adriamycin Liposome in Dogs after Hepatic Artery Embolization

Piao Xiang-hao, et al

Department of Radiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an

ABSTRACT: The targeting characteristics and pharmacokinetics of Adriamycin (ADM) in vivo were studied by the method of HPLC after hepatic artery embolization with the mixture of liposome of Adriamycin (LADM) and Lipiodol in dogs (group Ⅲ). They were respectively compared with those in dogs with ADM being infused into hepatic artery (group Ⅰ) and with hepatic arterial embolization using ADM-Lipiodol mixture (group Ⅱ). In contrast to group Ⅰ, ADM concentration in peripheral veins in group Ⅲ decreased significantly ($P<0.01$), but increased markedly for half life time in liver ($P<0.01$). Compared with group Ⅱ, ADM concentration in peripheral veins in group Ⅲ decreased ($P<0.05$), while its half life time increased ($P<0.05$) in liver. our findings indicated that LADM mixed with Lipiodol can improve its targeting to liver, increase the retention of ADM in liver can reduce the toxicity of ADM to heart and other organs. Therefore, it offers important advantages in the treatment of hepatic neoplasms.

Key words: Adriamycin; Adriamycin Liposome; Hepatic arterial embolization; Pharmacokinetics; HPLC

经导管肝动脉化疗栓塞(TACE)为目前治疗中晚期肝癌最有效的方法之一^[1,2],TACE 旨

在阻断肿瘤血流而导致其坏死,同时直接将化疗药物靶向至肿瘤部位并在局部缓慢释放,使

作者单位: 710038 (西安)第四军医大学唐都医院

其高浓度,长时间作用于肿瘤组织,进而达到提高疗效,降低化疗药物对肿瘤周围正常组织及其它器官毒副作用的目的。阿霉素(adriamycin, ADM)是一种在临床上广泛使用,有确切抗癌疗效的 Anthraecyine 类广谱抗癌抗生素^[3],其特点为抗癌谱广,活性强,但对心脏及骨髓及较强的毒副作用^[4]。对阿霉素脂质体(LADM)初步的研究表明,将其包封于脂质体静脉用药后有利于降低 ADM 的急性心脏毒性,提高体内滞留时间^[5~7],提高疗效^[8]。为了进一步提高 ADM 的靶向性,减少毒副作用,我们以逆向蒸发法制备了 LADM,并将 LADM 与碘油以“泵”法混合后对犬经导管肝动脉栓塞,以 RP-HPLC 法研究了 LADM 在犬体内的靶向行为及药代动力学特征。

材料和方法

一、药物

盐酸阿霉素对照品(上海医药工业研究院提供),盐酸阿霉素(意大利爱宝药厂提供),盐酸正定霉素(DM,意大利),40%碘油(上海信谊制药厂生产),其它所用试剂均为分析纯。肝动脉导管(5F 或 6F 单弯导管, Cook 公司产品),血管造影机(POLYOO-ROS-100 X 光机,附带数字减影装置 DIGITRON-TWO,西德西门子公司产),Shimadzu, Lc-6A 型高效液相色谱系统(日本);配 RF-530 荧光检测器, C-R3A 数据处理仪。分析柱为 YWG-C₁₈H₃₇柱(300mm×5mm,天津化学试剂二厂)。

二、动物及给药方法

健康杂种犬 15 只(10.6±1.8 kg)雌雄不拘(我校实验动物研究中心提供)。随机分成 3 组,每组 5 只。以 6%戊巴比妥按 30 mg·kg⁻¹ 静脉麻醉后固定于血管造影机台上,在 X 线影像透视下,均采用 Seldinger's 插管技术,经股动脉插管至肝左动脉。按如下方案给药:(I)组

ADM 水溶液, 2mg·kg⁻¹, (II)组 ADM-碘油(相当于 ADM 2mg·kg⁻¹, 用时以 2 ml 生理盐水溶解,再与 5 ml 碘油以“泵”法混匀, (III)组 LADM-碘油相当于 ADM 2mg·

kg⁻¹, 用时加 5 ml 碘油以“泵”法混匀。给药后定时从股静脉取血,以 RP-HPLC 法测定 ADM 的经时浓度。

三、高效液相色谱测定方法

按文献^[9]略加改进后制作。线性范围:取空白犬血浆 1.0 ml 或肝组织 1.0 g,加一系列浓度的 ADM 标准液,使血浆中 ADM 浓度分别为 50、100、200、600、1000 和 1200ng/ml,使肝组织中 ADM 浓度分别为 0.3、0.8、1.2、2.0、3.6 和 4.2μg/g,加入内标正定霉素(DM)液(20μg/ml)20μl,按血浆及肝组织中 ADM 检测法处理测定,以内标法定量,求解回归方程,方法回收率及精密度均按文献^[9]制作。

四、色谱条件

按文献^[9]略加改进:流动相为甲醇-0.01M 磷酸二氢铵-冰醋酸(70:30:0.5),色谱柱为 YWG-C₁₈H₃₇柱(300mm×5mm),流速 1.0 ml/min,激发波长 450 nm,发射波长 530 nm,室温。

五、样品的采集和预处理

(一)血样 在给药后的 5、10、15、30、45、60、120、180、240、360、480、600、720、1440、2160 和 2880 分钟时分别从股静脉抽取全血约 2ml,分离血浆后进行预处理,1.0 ml 血浆,加内标物 DM 标准液 20μl(20 μg/ml)混匀,加氯仿-甲醇(4:1)混合液 5.0 ml,振摇 5 min 后离心(3000r/min),精取氯仿层以氮气吹干,残渣加 50 μl 甲醇定容,进样 40μl 供 HPLC 分析。

(二)肝组织样品 3 组实验犬均于 10 h, 24 h 和 48 h 做腹腔切开术,从左外侧肝叶上取约 1.2 g 肝组织,立即做样本的预处理:1.0 g 肝组织加磷酸缓冲液(PH 7.8)2.0 ml,用直流恒温搅拌器以 6000 r/min 匀浆,加内标 20 μl(20 μg/ml),再加氯仿-甲醇(4:1)混合液 5.0 ml,提取方法同血样,残渣以 100 μl 甲醇定容,进样 40 μl 供 HPLC 分析。

六、数据统计

将三组犬给药后的经时血药浓度值在 Compaq 80386 微机上以 MCPKP 程序^[10]采用非线性最小二乘法自动拟合求得 ADM 房室模

型及药代动力学参数,权重选择 $W=1/g^2$ 。

结 果

一、线性范围、回收率和精密度试验结果

以 Y 为 ADM 与内标峰面积之比,以 X 为 ADM 的浓度,采用内标法求得血浆及肝组织中 ADM 的回归方程分别为_a。

血浆中: $Y=0.003273X-0.1382$ ($r=0.996, n=5$)

肝组织中: $Y=1.982X-0.467$ ($r=0.998, n=6$)

血浆中 ADM 的线性范围为 40~1200 ng/ml,肝组织中 ADM 浓度在 0.3~4.2 $\mu\text{g/g}$ 范围内线性良好,在 $S/N=3$ 时,求得 ADM 的最低检出浓度为 15 ng/ml,血浆中 ADM 的平均回收率为 102.2%,RSD 为 2.7%,肝组织中 ADM 的平均回收率为 98.6%,RSD 为 3.1%,ADM 在血浆及肝组织中分离的色谱图见图 1。

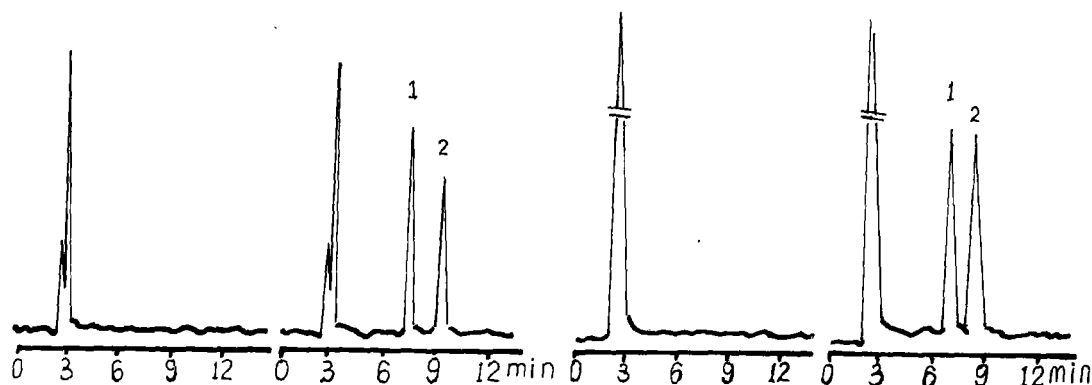


图 1 犬血和肝脏中 ADM 及内标 DM 的色谱图

二、在给药后的 10、24 和 48 h 对三组犬平行实施开腹手术,取左外侧肝叶经 RP-HPLC 法测定,测定结果的统计比较见图 2。三组犬外

周血管中 ADM 经时血药浓度的 RP-HPLC 测定结果见表 1。

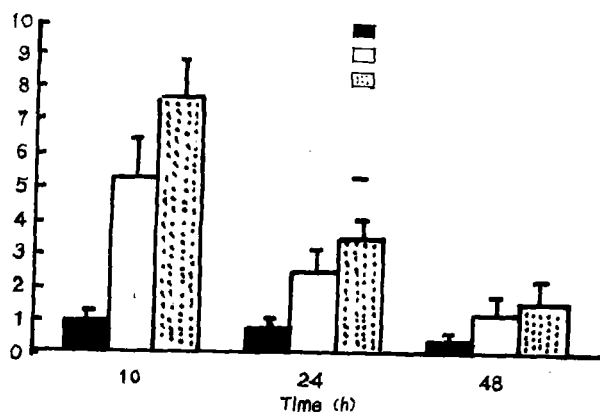


图 2 三组犬肝组织中 ADM 的浓度比较
($2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}, n=5, \bar{X} \pm s$)

三、将三组犬血浆中 ADM 的经时血药浓度测得值分别以 MCPKP 程序采用非线性最小二乘法在微机上自动拟合房室模型及药代动力学参数,结果表明:ADM 在三组犬体内的代谢均符合二房室开放模型,与肝动脉 ADM 溶液组相比,LADM 肝动脉栓塞后,ADM 在外周静脉中的浓度非常显著降低 ($P<0.01$),而 $T_{1/2\beta}$ 非常显著增加 ($P<0.01$);与肝动脉 ADM-碘油栓塞组相比,LADM 栓塞组外周静脉中 ADM 浓度显著降低 ($P<0.05$), $T_{1/2\beta}$ 显著增加 ($P<0.05$),三组犬血浆中 ADM 浓度与时间的函数方程如下:

表 1 犬肝动脉给药(ADM)后经时血药浓度($\bar{x} \pm s$)

time(min)	ADM	ADM-Lipiodol	LADM-Lipiodol
5	1058.04 \pm 182.29	529.10 \pm 102.00	
10	681.92 \pm 82.30	348.20 \pm 80.23	139.28 \pm 12.30 * * + +
15	462.30 \pm 62.30	231.220 \pm 65.11	97.10 \pm 10.32 * * + +
30	200.00 \pm 23.06	102.31 \pm 23.31	47.06 \pm 8.59 * * + +
45	132.00 \pm 12.53	65.28 \pm 12.34	31.98 \pm 6.30 * * + +
60	111.06 \pm 8.69	53.62 \pm 8.21	27.35 \pm 5.62 * * + +
120	98.81 \pm 8.20	48.41 \pm 6.85	25.66 \pm 4.87 * * +
180	85.30 \pm 7.36	43.72 \pm 6.34	24.05 \pm 4.20 * * +
240	81.20 \pm 7.62	42.63 \pm 4.36	23.87 \pm 5.08 * * +
360	78.20 \pm 8.64	41.82 \pm 4.25	23.67 \pm 3.31 * * +
480	76.10 \pm 6.91	41.01 \pm 3.64	23.51 \pm 5.91 * * +
600	73.14 \pm 6.87	40.86 \pm 3.27	23.08 \pm 4.34 * * +
720	69.31 \pm 6.93	40.45 \pm 3.74	22.91 \pm 3.82 * * +
1440	56.20 \pm 7.21	38.24 \pm 4.11	21.30 \pm 2.22 * * +
2160	41.10 \pm 5.60	30.12 \pm 3.02	19.92 \pm 3.65 * * +
2880	31.26 \pm 4.32	20.84 \pm 1.91	17.34 \pm 3.81 *

* $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ + $P < 0.05$, + + $P < 0.01$

ADM 组: $C = 1473.77e^{-0.0815t} + 93.37e^{-0.0004t}$

LADM-Lipiodol 组: $C = 275.02e^{0.0793t} + 24.91e^{-0.0002t}$

ADM-Lipiodol 组: $C = 707.38e^{0.0739t} + 47.43e^{-0.0003t}$

药代动力学参数的拟合结果见表 2

表 2 犬肝动脉给药后 ADM 的药代动力学参数比较($2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n=5$, $\bar{x} \pm s$)

	ADM	ADM-Lipiodol	LADM-Lipiodol
$\alpha(\text{min}^{-1})$	0.0815 \pm 0.0214	0.0799 \pm 0.0114	0.0793 \pm 0.0328
$\beta(\text{min}^{-1})$	0.0004 \pm 0.0001	0.0003 \pm 0.0001	0.0002 \pm 0.0001 *
$T_{1/2\alpha}(\text{min})$	8.5062 \pm 1.8234	8.6762 \pm 2.3198	8.7382 \pm 3.5821
$T_{1/2\beta}(\text{min})$	1817.8 \pm 745.2	2748.1 \pm 976.2	5894.2 \pm 1224.8 * * +
$K_{12}(\text{min}^{-1})$	0.0707 \pm 0.0246	0.0711 \pm 0.0362	0.0714 \pm 0.0410
$K_{21}(\text{min}^{-1})$	0.0062 \pm 0.0022	0.0053 \pm 0.0021	0.0067 \pm 0.0026
$K_{el}(\text{min}^{-1})$	0.0060 \pm 0.0032	0.0038 \pm 0.0011	0.0014 \pm 0.0006 * +
$V_1(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.0013 \pm 0.0007	0.0027 \pm 0.0009	0.0067 \pm 0.0071
$V_B(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.0199 \pm 0.0086	0.0403 \pm 0.0085	0.0798 \pm 0.0271 * * +
$CL_B(\text{ML} \cdot \text{min} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.0178 \pm 0.0041	0.0124 \pm 0.0051	0.0087 \pm 0.0035 *
$AUC(\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1})$	263020 \pm 14211	196930 \pm 12246	215360 \pm 13268 * +

讨 论

一、从图 2 可见,三组犬在给药后的 10 h, LADM-Lipiodol 组在肝脏中 ADM 的含量非常显著的高于 ADM 及 ADM-Lipiodol 组($P < 0.01$),在 24 h 时仍非常显著的高于 ADM 组($P < 0.01$),显著高于 ADM-Lipiodol 组($P < 0.05$),直至 48 h 时仍保持显著高于 ADM 组($P < 0.05$),同时,从表 1 可见,在 10 h 和 24 h 时外周静脉血管中,(Ⅲ)组的 ADM 水平均非常显著的低于(Ⅰ)组($P < 0.01$),显著的低于(Ⅱ)组($P < 0.05$),至 48 h 时仍显著低于(Ⅰ)组。从 ADM 在肝及外周静脉中的转运变化趋势可见,LADM-Lipiodol 组对肝脏的靶向性更

05),直至 48 h 时仍保持显著高于 ADM 组($P < 0.05$),同时,从表 1 可见,在 10 h 和 24 h 时外周静脉血管中,(Ⅲ)组的 ADM 水平均非常显著的低于(Ⅰ)组($P < 0.01$),显著的低于(Ⅱ)组($P < 0.05$),至 48 h 时仍显著低于(Ⅰ)组。从 ADM 在肝及外周静脉中的转运变化趋势可见,LADM-Lipiodol 组对肝脏的靶向性更

强,外周扩散程度最低,因而对外周其它器官(如心脏,脊髓等)所产生的毒副作用可能会更小,提示:在对 LADM 进一步研制后以 TACE 法在临床上应用后可能获得更高的抗癌效果,并大大减小 ADM 的毒性。

二、从三组犬药代动力学参数结果(表 2)可见,(Ⅲ)组的 $T_{1/2\beta}$ 非常显著的低于(Ⅰ)组($P<0.01$),显著的低于(Ⅱ)组($P<0.05$),我们认为产生这一现象的原因可能为:LADM-Lipodal 在肝脏中有更为缓慢的释放,并逐渐扩散至外周静脉及组织中,进而扩大了机体对 ADM 的半衰周期,从总清除率 CLB 结果来看,(Ⅲ)组显著少于(Ⅰ)组($P<0.05$)。这也说明了(Ⅲ)组在机体内的清除是较为缓慢的。总之,通过三组犬的对比结果表明:阿霉素脂质体经 TACE 法后具有更为优势的靶向特征,并可达到缓释效果,同时因为靶向性的提高而降低了对心脏等器官的毒性。本试验项目的深入研究为临床中晚期或不可手术切除的癌症患者提供了新的治疗希望。

参考文献

1. Chuang V, Sidney W. Hepatic artery embolization in the treatment of hepatic neoplasms. *Diag Radiol.* 1981;140:51.
2. Kunihiro O, Seiji T, Lakatsune N, et al. Arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma with mitomycin C microcapsules. *Radiology* 1984;152:51.
3. Hironobu N, Tsutomu H, Hiromichi (), et al. Transcatheter oily chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Radiology.* 1989;170:783.
4. Jones C, Gray BN. Enhanced in vivo activity of adriamycin incorporated controlled release microspheres. *Br. J. Cancer.* 1989;59:743.
5. Hoese Q, Steerenberg PA, Crommelin DJ, et al. Reduced cardiotoxicity and nephrotoxicity with preservation of antitumor activity of doxorubicin entrapped in stable liposomes. *Cancer Research* 1984;44:3698.
6. Gabizon A, Dagan D, Goren Y, et al. Liposomes as in vivo carriers of adriamycin; reduced cardiac uptake and preserved antitumor activity in mice. *Cancer Research* 1982;42:4734.
7. 孙淑英,顾学裘. 脂质体作为抗癌抗生素载体的研究概况,沈阳药学院学报 1989;6:73.
8. Eric A. Forsen A, Zoltan A. Improved therapeutic benefits of doxorubicin entrapment in anionic Liposomes. *Cancer Research* 1983;43:546.
9. 何素梅,魏树礼,吴传斌等. 反相高效液相色谱荧光检测法测定血浆或肝组织中阿霉素含量. 药物分析杂志,1994;14:8.
10. Xia WJ, MCPKP-a microcomputer program specialized for pharmacokinetic compartment analysis. *Acta pharmacol sin.* 1988;9:192.

关于统计学符号的书写

本刊已实行国家标准 GB3358—82《统计学名词及符号》的有关规定。为此,请作者的书写统计学符号时注意以下规格:(1)样本的算术平均数用英文写 \bar{x} 表示,不用大写 X,也不用 Mean 或 M;(2)标准差用英文小写 s,不用 SD;(3)标准误用英文小写 $S_{\bar{x}}$,不用 SE;(4)t 检验用英文小写 t;(5)F 检验用英文大写 F;(6)卡方检验用希文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r;(8)自由度用希文小写 μ ;(9)样本数用英文小写 n;(10)概率用英文大写 P;(11)以上符号 \bar{x} 、s、t、F、 χ^2 、r、 μ 、n、P 为均用斜体。望作者注意并遵照执行。

本刊编辑部