

• 实验研究 Experimental research •

利多卡因-表柔比星-超液化碘油混合乳剂在体外及兔肝癌模型中缓释效果的研究

杨 钦, 程芝梅, 王黎洲, 蒋天鹏, 周 石

【摘要】 目的 探讨利多卡因-表柔比星-超液化碘油混合乳剂在体外缓释效果,及兔 VX2 肝癌模型经肝动脉化疗栓塞中利多卡因与碘油乳化后,肝癌组织中利多卡因的动态分布情况。**方法** 采用 W/O 法对利多卡因-表柔比星乳剂进行体外理化实验,并在 72 h 内测定利多卡因-表柔比星-碘油乳剂的累积缓释量。随机选取 48 只新西兰白兔,超声引导下经皮穿刺建立兔 VX2 肝癌模型,分为实验组和对照组,每组 24 只,实验组以利多卡因-表柔比星-碘油混合乳剂进行栓塞,对照组先予以动脉内灌注利多卡因,再以表柔比星-碘油混合乳剂行栓塞,分别于术后的 0.5、1、4、8、24、48、96、144 h 时间点处死实验组及对照组各 3 只兔子,取肝癌组织,经 UPLC-MS/MS 测定癌组织中利多卡因药物浓度,通过 Graphpad 软件拟合肝癌组织中的利多卡因药物浓度随时间变化曲线。采用独立样本 *t* 检验比较 TACE 中利多卡因油包水技术和单纯灌注后肝癌组织中利多卡因的动态变化情况。**结果** 体外实验中,利多卡因-表柔比星-碘油乳剂 0~72 h 内利多卡因浓度达到 T50% 约需 30 min。24 h 内利多卡因释放量超过 80%。动物实验中,VX2 肝癌模型建模成功率和 TACE 术成功率均为 100%。与对照组相比,实验组兔肝癌组织中利多卡因的药物浓度显著增加、清除显著降低,肿瘤组织内的利多卡因停留时间延长。**结论** 利多卡因-表柔比星-碘油乳剂对利多卡因具有缓释作用,利多卡因与碘油乳化后经 TACE 治疗可增加各时间段组织中利多卡因的浓度,验证了利多卡因混合碘油后在肝脏内血管具有缓慢释放的效果。

【关键词】 肝动脉化疗栓塞术;利多卡因;兔 VX2 肝癌模型;超高效液相色谱-质谱联用法

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2023)-01-0043-05

The slow-release effect of lidocaine-epirubicin-superliquefied lipiodol mixed emulsion in vitro and in rabbit liver cancer models YANG Qin, CHENG Zhimei, WANG Lizhou, JIANG Tianpeng, ZHOU Shi. School of Medical Imaging, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: ZHOU Shi, E-mail: 156722229@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the slow-release effect of lidocaine-epirubicin-superliquefied lipiodol mixed emulsion in vitro, and to investigate the dynamic distribution of lidocaine in the liver cancer tissues of the rabbit VX2 liver cancer models after receiving hepatic artery chemoembolization by using lidocaine-epirubicin-superliquefied lipiodol mixed emulsion. **Methods** By using W/O method, the physicochemical properties of lidocaine-epirubicin emulsion was tested in vitro, and the cumulative sustained-release amount of the lidocaine-epirubicin-superliquefied lipiodol mixed emulsion within 72 hours was determined. A total of 48 New Zealand white rabbits were randomly selected to establish the rabbit VX2 liver cancer models by ultrasound-guided percutaneous puncture. The rabbits were divided into experimental group and control group, with 24 rabbits in each group. The rabbits of the experimental group received hepatic artery chemoembolization with lidocaine-epirubicin-superliquefied lipiodol mixed emulsion, while the rabbits of the control group received in-arterial infusion of lidocaine followed by embolization with epirubicin-superliquefied lipiodol mixed emulsion. Every 3 rabbits from each group were separately sacrificed each time at postoperative 0.5, 1, 4, 8, 24, 48, 96, and 144 hours. The liver cancer tissues were collected, and the lidocaine concentration in cancer tissues was determined by UPLC-MS/MS, and the lidocaine concentration changing curve with time in liver cancer tissues was analyzed by Graphpad software.

Independent sample *t*-test was used to compare the dynamic changes between lidocaine water-in-oil technique and pure lidocaine perfusion in hepatic artery chemoembolization. **Results** In vitro testing, it took about 30 minutes before the lidocaine concentration within the lidocaine-epirubicin-superliquesified lipiodol mixed emulsion reached to T50%. Within 24 hours, the cumulative sustained-release amount of lidocaine exceeded 80%. In animal experiment, both the success modeling rate of VX2 liver cancer and the technical success rate of hepatic artery chemoembolization were 100%. Compared with the control group, in the liver cancer tissues of the experimental group the concentration of lidocaine was significantly increased, the clearance of lidocaine was obviously decreased, and the retention time of lidocaine within the tumor tissues was remarkably prolonged. **Conclusion** Lidocaine-epirubicin-superliquesified lipiodol mixed emulsion has a slow-release effect on lidocaine. Hepatic artery chemoembolization by using lidocaine emulsified with iodized oil can increase the concentration of lidocaine in the liver cancer tissues during each time period, which proves that the lidocaine can be slowly released into the liver cancer tissues after it is mixed with iodine oil.

【Key words】 hepatic artery chemoembolization; lidocaine; rabbit VX2 liver cancer model; UPLC-MS/MS

原发性肝癌是常见的恶性肿瘤之一,按病理类型可分为:原发病灶起源于肝细胞的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)及原发灶起源于肝内胆管上皮细胞的胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC),其中超过90%为HCC^[1-2]。大多数肝癌患者在确诊时已为中晚期,失去手术机会。因此,超过70%的肝癌患者需要接受非根治性的治疗方法,其中经动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是中晚期HCC的重要治疗方法^[3-6]。然而TACE术后有近90%的患者存在不同程度的腹痛症状,术中常使用的栓塞剂如抗癌药物-碘油混合剂也会刺激、损伤微血管内膜,引起血管收缩,导致疼痛^[7-12]。研究表明,经肝动脉推注利多卡因是一种安全有效的缓解TACE术中疼痛的方法^[13]。但利多卡因很快进入血液循环而稀释,其效果可能是一过性的。延长利多卡因的作用时间对于疼痛的持续控制非常关键。碘油是TACE术中常用的化疗药物载体,与化疗药物混合后经肝动脉直接注射,局部的血药浓度是全身的200倍以上^[14-16]。本研究观察利多卡因-碘油混合乳剂的理化稳定性、TACE术后病灶局部的药物浓度,以及术中使用利多卡因-表柔比星-碘油混合乳剂达到缓释的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级新西兰白兔48只,6月龄,体质量为(2.5±0.2) kg,由贵州医科大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(黔)2018-0001。每只兔独立饲养,专用颗粒兔维持饲料每日投食50 g,2次/d。动物房室内温度20~25℃,湿度45%~75%,每天光

照12 h,饲养1周。

1.2 利多卡因-表柔比星-碘油混合乳剂理化实验

1 mL利多卡因-表柔比星乳剂(含20 mg利多卡因,10 mg表柔比星)与2 mL超液化碘油泵送交换法混合。以1次/s的速度进行20次泵送交换后得到利多卡因-超液化碘油混合乳剂。利多卡因-表柔比星-碘油混合乳剂的稳定性采用理化实验方法测定,物理评估是通过肉眼观察沉淀的存在,颜色变化和相分离,由两名观察者使用黑白背景进行视觉检查。化学稳定性评估是通过UPLC-MS/MS进行分析,检测0.5、1、4、8、12、16、20和24 h表柔比星和利多卡因的浓度。该系统是由LPG-3400SDN溶剂输送系统、WPS-3000SL自动进样装置和二极阵列检测器(DAD-3000)组成的光谱物理分析高效液相色谱链。柱为Hypersil ODS2(4.6 mm, 250 mm, 5 μm)。流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(55:45),流速为1 mL/min。每次分析进样量10 μL,分析时间为20 min。兼容须满足以下标准^[17-18]:①目测无相分离、无宏观沉淀的迹象、无颜色变化;②24 h时乳状液中利多卡因和表柔比星的浓度为0时浓度的90%;③HPLC未检测到利多卡因或表柔比星降解产物。

1.3 药物缓释测量

配制含有1 mol/L K₂PO₄ 0.7 mL和0.5 mol/L K₂HPO₄ 16 mL的磷酸盐缓冲释放液,体积为500 mL,将利多卡因-表柔比星-碘油乳剂密封在透析袋中,泵入释放介质后立即倒入。于37℃培养箱内的旋转摇床上,以60 rpm的速度搅拌以促进药物释放。测定沉底乳状液中利多卡因的释放量,收集中间层释放介质约10 mL,以消除取样的可变性。3000 r/min离心5 min,中间层离心取样品3 mL。采用高效液

相色谱法测定样品,利多卡因波长 196 nm。在泵送后 0、8、30、60、120、240、480、1 440、2 880 和 4 320 min 进行测量。

1.4 建立肝癌兔模型

取 1 只新西兰白兔作为荷瘤兔。取 VX2 肿瘤组织 1.5 ~ 2.0 cm³,剥离瘤周组织和肿瘤包膜,将瘤周灰色鱼肉组织切成 1 ~ 2 mm³作为肿瘤种。实验白兔用 20% 乌拉坦 (5 mL/kg) 经耳缘静脉麻醉后,无菌条件下打开腹膜腔、暴露肝脏,用瘤块嵌插包埋法植入肿瘤种 3~5 块,瘤块植入后回纳肝脏、逐层缝合。2 周后行 CT 检查,测量肿瘤最大径(d1)和与其呈垂直方向的最小径(d2),利用椭球体体积计算公式 $[V=0.5 \times d1 \times (d2)^2]$ 计算肝癌体积。将 48 只新西兰白兔肿瘤种植成功后,采用随即区组设计法按体重分为 2 组,实验组:TACE 中使用利多卡因-表柔比星-超液化碘油混合乳剂栓塞处理;对照组:TACE 中先经供血动脉灌注利多卡因(20 mg/kg),再使用表柔比星-超液化碘油混合乳剂栓塞。

1.5 兔肝癌 TACE 模型建立

肿瘤直径达到 2.0 cm 后行兔模型 TACE 术。20% 乌拉坦经耳缘静脉麻醉肝癌兔,仰卧固定于 DSA 手术台上,腹股沟区常规消毒、铺巾,充分暴露右侧股动脉,插入 4 F 血管鞘,用超滑导丝将 4 F-Cobra 导管引入肝总动脉,进行腹腔动脉造影确定肝动脉解剖,减影见肝左动脉血管分支增多、走行迂曲、紊乱,静脉期可见肝左叶内见肿瘤染色灶。造影确认后引入 2.7 F Cook 微导管经肝总动脉超选择插管于肝动脉肿瘤供血动脉,根据分组方案行血管栓塞术,血流减慢后减影见病灶内碘油沉积可,血流减慢后减影示肿瘤供血动脉分支栓塞可。术毕退出导管及血管鞘,并缝合伤口。实验结束后处死各组动物。苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察肿瘤的组织形态学改变。

1.6 肿瘤组织和血浆中利多卡因浓度的测定

肿瘤组织中利多卡因浓度的测定:分别于 TACE 后 0.5、1、4、8、24、48、96、144 h,采集对照组和实验组各 3 只兔肿瘤标本。取 VX2 肿瘤组织称重,用 0.9% NaCl 溶液洗去表面浮血,滤纸吸干,称取组织 0.1 g,以 0.9% NaCl 溶液制成 10% 匀浆。取匀浆液 50 μ L,加入 50 μ L 内标液,涡混均匀,加入 400 μ L 甲醇,涡混 3 min,室温超声 3 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,37℃下用 N₂吹干,残渣加入 10% 乙腈溶液 1 mL,涡混 3 min,室温超声 3 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 μ L,用初始流动相稀释至

1 mL,经 UPLC-MS/MS(ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S 超高效液相色谱-三重四级杆质谱串联仪)分析测定。利多卡因波长 196 nm,连续测量 24 h,测量完毕后绘制药物流体浓度时间曲线,分析各组动物瘤体中药物浓度。血浆中利多卡因浓度的测定:取血浆 50 μ L,余操作同上述匀浆液的步骤,对比分析各组动物外周血中药物浓度。

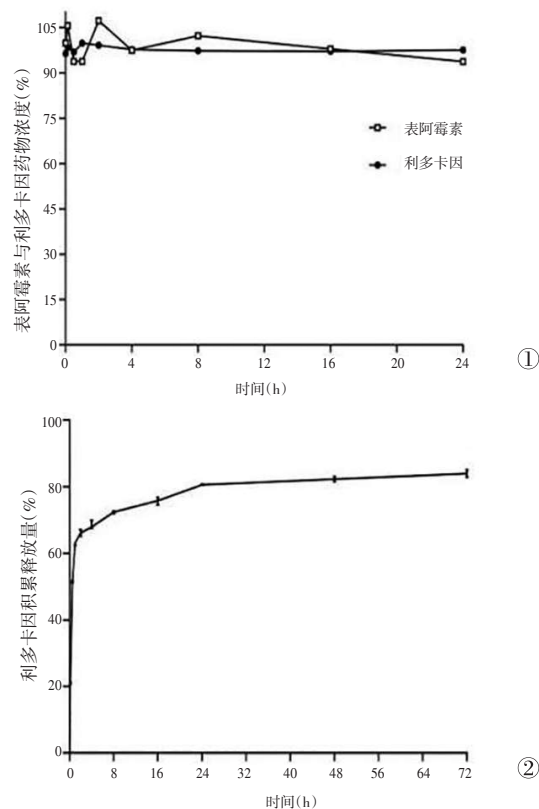
2 结果

2.1 理化稳定性

连续观察利多卡因-表柔比星乳剂 24 h,目测未见利多卡因-表柔比星乳剂相分离及颜色变化。24 h 后,利多卡因和表柔比星的浓度都保持在 90% 以上。色谱图显示,利多卡因-表柔比星乳剂样品在冷藏后 24 h 内保持稳定,没有观察到降解产物。在此期间,利多卡因-表柔比星乳剂样品保持清晰,除利多卡因和表柔比星对应的两个峰外,色谱图中无其他峰。因此,外加剂被认为是物理和化学稳定的。

2.2 利多卡因-碘油乳剂的释放曲线

利多卡因-表柔比星-碘油乳剂 0 ~ 72 h 内利多卡因累积释放量如图 1 所示。T50% 大约需要 30 min。24 h 内,利多卡因释放量超过 80%。



①不同时间点利多卡因和表阿霉素的浓度;②利多卡因累积释放量

图1 利多卡因-碘油乳剂的释放曲线

2.3 兔肝癌模型建立及TACE模型建立

所有实验兔均成功建立了VX2肝癌模型,并经TACE治疗,至获取组织样本时无出血、死亡等并发症发生。TACE手术减影见图2。

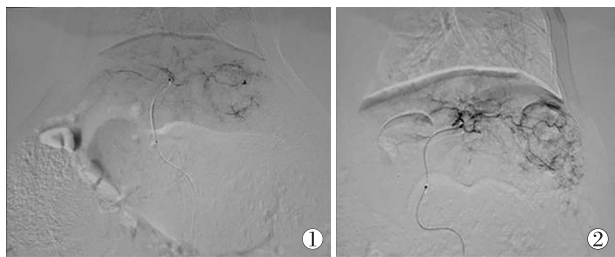


图2 兔TACE术中肝癌DSA造影图像

2.4 肿瘤组织中利多卡因浓度曲线

浓度-时间曲线显示,实验组肿瘤组织内利多卡因浓度缓慢升高,最高为 $(6.80 \pm 0.91) \mu\text{g}/\text{mg}$,而对照组瘤内利多卡因浓度仅为 $(0.59 \pm 0.36) \mu\text{g}/\text{mg}$ 。经Graphpad 8.0软件拟合利多卡因在兔肝脏肿瘤组织中分布的时间-浓度曲线见图3。

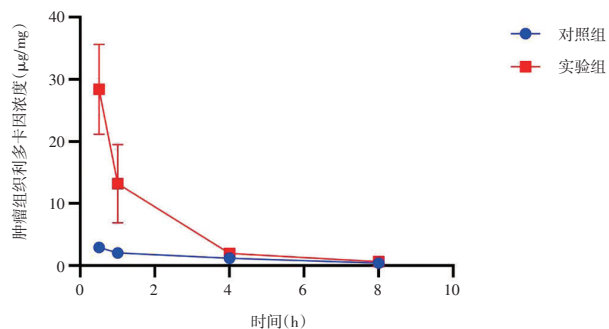


图3 肝脏肿瘤组织中利多卡因浓度-时间曲线

2.5 血浆中利多卡因浓度曲线

各时期血浆中利多卡因浓度经UPLC-MS/MS分析测定,数据经Graphpad 8.0软件拟合利多卡因在兔外周血中的平均浓度-时间曲线见图4。

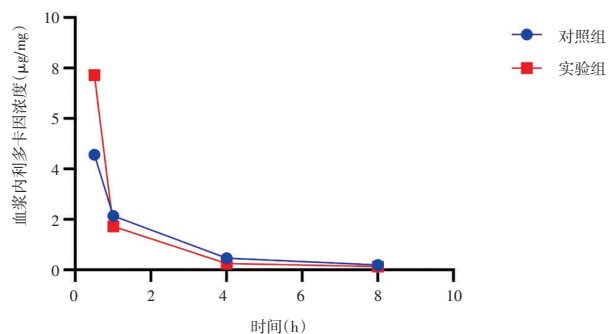


图4 血浆中利多卡因浓度-时间曲线

3 讨论

目前的动物研究结果表明,利多卡因-表柔比星-碘油乳剂可以缓慢释放利多卡因。利多卡因是一种局部镇痛药,但利多卡因的消除半衰期较短,TACE术后疼痛的长期控制需要利多卡因的持续释放,可通过利多卡因-表柔比星-碘油乳剂的缓慢释放达到长期镇痛效果。

本研究的体外实验分析了利多卡因-表柔比星-碘油混合乳剂的理化性质,表明碘油与利多卡因、表柔比星混合后,其疗效不会受到影响。UPLC-MS/MS法检测家兔肝癌组织中利多卡因药物浓度,结果表明利多卡因与内标之间的分离度良好且无内源性干扰,专属性良好;肝癌组织中利多卡因线性关系良好;日间和日内精密密度RSD均小于5%,准确度均大于95%,且回收率和基质效应均大于97%,说明此方法有良好的回收率且无明显的基质效应。以上方法学参数符合生物样品检测要求,且该法具备快速、简便、高效的特点。

利多卡因在脑、脑脊液、脊髓、肾、心、肺、肝等组织中均有分布,但因不同的给药方式、不同剂量,利多卡因在不同组织中的分布规律不同。利多卡因经血液循环后首先分布到血流速度较快的组织中,如心脏、肝、脾等,紧接着再分布到血流速度慢的组织,如肺、胆汁、肾等^[19]。动脉内灌注利多卡因是减轻患者疼痛的主要措施^[20]。文献报道,利多卡因-表柔比星-碘油乳化剂在肝癌手术中能够消耗预期的碘油用量,引起的疼痛最轻^[21]。这可以减少TACE治疗术后患者止痛药物的使用时间用量,改善患者术后生活质量^[22]。本实验结果表明,在4 h前实验组肝癌组织内利多卡因的浓度比对照组高很多,虽然4 h后浓度下降,但仍然高于对照组。

利多卡因的半衰期很短,栓塞前经肝动脉灌注利多卡因很难将镇痛效果维持至治疗结束,且血流对药物的冲刷可减少动脉中利多卡因的药物浓度,使镇痛效果更差。本实验以利多卡因-表柔比星-超液化碘油乳剂给药,延长了利多卡因在组织内的时间,增强了镇痛效果。分析原因主要是:①碘油乳剂中混合的利多卡因在栓塞后缓慢释放;②伴随碘油一起注入的利多卡因在肝肿瘤组织内的停留时间延长,血液流动的停止使肿瘤组织内的液体循环趋于停滞,使组织内利多卡因的释放减缓^[23-25]。

综上所述,应用油包水技术将利多卡因与碘油混合乳化后可增加组织中利多卡因的浓度,将其用于TACE术后镇痛是有效和安全的。

[参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69: 7–34.
- [2] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2018, 391:1301–1314.
- [3] Wang A, Wu L, Lin J, et al. Whole-exome sequencing reveals the origin and evolution of hepato-cholangiocarcinoma [J]. Nat Commun, 2018, 9:894.
- [4] Chang Lee R, Tebbutt N. Systemic treatment of advanced hepatocellular cancer: new hope on the horizon [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2019, 19:343–353.
- [5] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 87–108.
- [6] Reynolds AR, Furlan A, Fetzer DT, et al. Infiltrative hepatocellular carcinoma: what radiologists need to know [J]. Radiographics, 2015: 371–386.
- [7] Khalaf MH, Sundaram V, Abdelrazek MM, et al. A predictive model for postembolization syndrome after transarterial hepatic chemoembolization of hepatocellular carcinoma [J]. Radiology, 2019, 290: 254–261.
- [8] Lv N, Kong Y, Mu L, et al. Effect of perioperative parecoxib sodium on postoperative pain control for transcatheter arterial chemoembolization for inoperable hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial [J]. Eur Radiol, 2016, 26: 3492–3499.
- [9] Kanematsu M, Semelka RC, Leonardou P, et al. Hepatocellular carcinoma of diffuse type: MR imaging findings and clinical manifestations[J]. J Magn Reson Imaging, 2003, 18: 189–195.
- [10] Yau T, Tang V, Yao TJ, et al. Development of Hong Kong liver cancer staging system with treatment stratification for patients with hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2014, 146: 1691–1700.
- [11] Dai QS, Gu HL, Ye S, et al. Transarterial chemoembolization vs. conservative treatment for unresectable infiltrating hepatocellular carcinoma: a retrospective comparative study[J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2: 1047–1054.
- [12] Jang ES, Yoon JH, Chung JW, et al. Survival of infiltrative hepatocellular carcinoma patients with preserved hepatic function after treatment with transarterial chemoembolization[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139: 635–643.
- [13] Lee SH, Hahn ST, Park SH. Intraarterial lidocaine administration for relief of pain resulting from transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: its effectiveness and optimal timing of administration[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2002, 24: 368–371.
- [14] Nault JC, Nkontchou G, Nahon P, et al. Percutaneous treatment of localized infiltrative hepatocellular carcinoma developing on cirrhosis[J]. Ann Surg Oncol, 2016, 23: 1906–1915.
- [15] Duan F, Bai YH, Cui L, et al. Transarterial embolization with N-butyl 2-cyanoacrylate for the treatment of arterioportal shunts in patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Ther, 2017, 13: 631–635.
- [16] Sieghart W, Huckle F, Peck-Radosavljevic M. Transarterial chemoembolization: modalities, indication, and patient selection [J]. J Hepatol, 2015, 62: 1187–1195.
- [17] Masada T, Tanaka T, Nishiofuku H, et al. Techniques to form a suitable lipiodol-epirubicin emulsion by using 3-way stopcock methods in transarterial chemoembolization for liver tumor [J]. J Vasc Interv Radiol, 2017, 28: 1461–1466.
- [18] Trissel LA. Avoiding common flaws in stability and compatibility studies of injectable drugs [J]. Am J Hosp Pharm, 1983, 40: 1159–1160.
- [19] 王振华. 利多卡因硬膜外麻醉意外法医毒物动力学研究(八) [D]. 太原:山西医科大学, 2008.
- [20] 王天成, 马 聪, 肖煜东, 等. 利多卡因-表柔比星-超液化碘油混合乳剂在肝癌TACE相关疼痛管理中的应用[J]. 介入放射学杂志, 2020, 29: 366–371.
- [21] 李 军, 裴敏剑, 章士正. 肝癌经导管动脉栓塞化疗术中利多卡因碘油乳剂止痛效果评价[J]. 全科医学临床与教育, 2011, 9: 431–432.
- [22] 陈丽霞, 杨永明, 魏锦萍, 等. 利多卡因对丝裂霉素治疗肝癌 H22 荷瘤小鼠的增敏作用研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2019, 31: 84–87.
- [23] 曾志宏, 王 奕, 胡含明, 等. 利多卡因-碘油乳剂在原发性肝癌介入栓塞治疗中的临床应用[J]. 中国中西医结合影像学杂志, 2009, 7: 151–152.
- [24] 王小会, 鲁 岩. 利多卡因碘油乳剂在经导管动脉内化疗栓塞中的止痛效果评价[J]. 肿瘤基础与临床, 2011, 24: 224–246.
- [25] Wang Y, Ou-Yang QG, Huang WL, et al. Investigation of the inhibitory effect of simvastatin on the metabolism of lidocaine both in vitro and in vivo [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 1739–1747.

(收稿日期: 2021-09-06)

(本文编辑: 靳 宇)