



大鼠外用脂质体鬼臼毒素后血液中鬼臼毒素浓度观察

脂质体作为靶向性药物载体是当前具有重大理论和应用价值的研究领域。本研究用二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)作为膜材制成脂质体包裹鬼臼毒素,利用其可使包裹药物对表皮的靶向性浓集特性,使鬼臼毒素向表皮细胞浓集并缓慢释放,达到用药局部有较高的药物浓度而系统吸收较少。本实验旨在测定脂质体鬼臼毒素外用后鬼臼毒素的血药浓度,推测脂质体鬼臼毒素外用的全身吸收规律。

1 资料与方法

1.1 实验动物

SD大鼠购自第一军医大学实验动物中心,雌雄不拘,体质量(200±20) g。

1.2 主要试剂及仪器

脂质体鬼臼毒素混悬液的制备方法及其质量鉴定等参考文献[1]。本研究用凝胶过滤法测得脂质体的包封率为(74.3±5.1)%;0.5%鬼臼毒素酞剂(国产尤脱欣);无水乙醇和三氯乙酸均为汕头市光华化学厂产品,分析纯;RF-5000荧光分光光度计(日本岛津);TGL-1G台式低温超速离心机(日本日立公司)。

1.3 方法

1.3.1 分组 实验大鼠随机分为2组,每组48只。观察组涂抹0.5%脂质体鬼臼毒素混悬液;对照组涂抹0.5%鬼臼毒素酞剂。

1.3.2 涂药方法 大鼠用异戊巴比妥钠(25 mg/kg·b.w.)麻醉后,俯卧位固定大鼠于操作台上,选取右侧背部约1.5 cm×1.5 cm作为涂药区,电动剃须刀剃净鼠毛。用2 ml注射器吸取药物,每次涂药量均为6滴,控制涂药量相同,用玻璃棒轻轻涂抹药物约20 s,使药物分布均匀。分别在取血前1、2、4、6、8、10、12及24 h涂药,每个时间点涂6只大鼠。

1.3.3 取材 最后一次涂药结束,同时大鼠心脏采血3~4 ml,并取空白血。

1.3.4 测定方法

1.3.4.1 绘制标准曲线 精密称取鬼臼毒素10 mg,用无水乙醇稀释,配制成浓度为100 mg/L的标准储备液100 ml备用。取空白血,低温离心(10 000 r/min, 15 min),取血清2 ml,加入三氯乙酸(200 mg/ml)振荡2 min,离心(6 000 r/min, 5 min),得去蛋白的血清液。取储备液加用无水乙醇稀释成50、100、150、200、250、300 ng/ml,用荧光分光光度法测定荧光值,绘制标准曲线。空白血清相同稀释倍数后,同样测定荧光值,表明空白血清对鬼臼毒素的荧光测定没有影响。

1.3.4.2 样品测定 样品血如上法分离得去蛋白血清,分别取去蛋白血清1 ml,用无水乙醇稀释成适当的倍数,用荧光分光光度法测定荧光值,根据随行标准曲线得出各样品的鬼臼毒素浓度。

1.4 统计方法

采用SPSS8.0统计软件进行统计分析。差异的显著性分析采用两组完全随机化设计资料均数的t检验。鬼臼毒素血药浓度(C_p)的曲线下面积(area under the plasma concentration curve, AUC)根据扫描结

果， 运用公式：

$$AUC = \sum_{i=1}^6 (C_i + C_{i+1})(t_{i+1} - t_i) / 2 \text{ 计算。}$$

2 结果

2.1 标准曲线

标准浓度的鬼臼毒素溶液的荧光值(EX/EM: 290/633 nm, 狭缝均为2 nm)与浓度的关系经相关分析处理, $r=0.999$, 说明鬼臼毒素浓度(50~500 ng/ml)和荧光强度呈线性关系。测定方法的回收率为(95.6±2.7)%。

2.2 样品检测结果

0.5%脂质体鬼臼毒素混悬液与对照组(0.5%鬼臼毒素酊剂)外用后鬼臼毒素的血药浓度见图1。结果显示: 对照组鬼臼毒素的血药浓度上升较快, 在涂药2 h后血药浓度达到峰值[(166.395±14.634) ng/ml]; 观察组鬼臼毒素的血药浓度上升缓慢, 在涂药8 h后血药浓度才达到峰值[(378.603±26.105) ng/ml]; 观察组涂药后鬼臼毒素的血药峰值浓度明显低于对照组, 两者相比有显著性差异($P<0.001$)。鬼臼毒素的AUC结果显示: 鬼臼毒素酊剂(4 609.347 ng/ml·h)是脂质体制剂(2 020.157 ng/ml·h)的2.3倍, 说明脂质体鬼臼毒素混悬液外用的全身吸收较鬼臼毒素酊剂少。由于本实验采用各时间点涂6只大鼠, 故只能算出平均AUC。

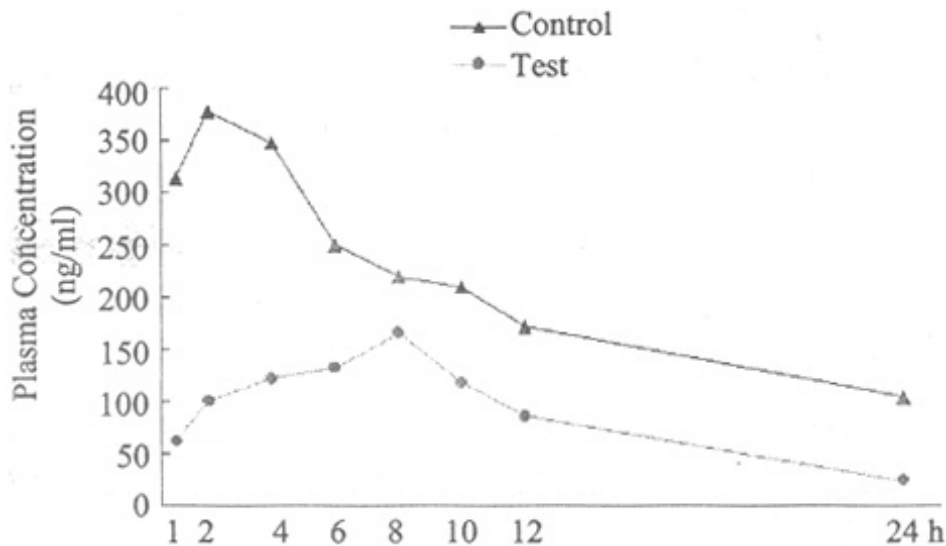


图1 两种剂型涂药后不同时间鬼臼毒素的血药浓度变化曲线

Fig.1 Curve of changes in plasma concentration of podophyllotoxin after drug application by the two methods

Control: Podophyllotoxin alcohol solution; Test: Liposome podophyllotoxin

3 讨论

0.5%的鬼臼毒素酊剂作为治疗尖锐湿疣的首选药物在临床上广泛应用。但鬼臼毒素酊剂只能消除可见皮损, 对潜伏感染效果不佳, 因此难以预防尖锐湿疣的复发, 而且大面积使用时易产生吸收毒性, 限制了它的使用[2]。我们在前期研究中发现鬼臼毒素本身具有可测的紫外荧光性[3], 为本研究建立的荧光分光光度测定法测定药物浓度提供了依据。结果显示血药浓度在50~500 $\mu\text{l/L}$ 的范围内, 血药浓度和荧光值相关性很好, 同

时空白血清对鬼臼毒素的测定无影响,说明该方法准确可靠,可作为临床上监测鬼臼毒素血药浓度的方法。

El-Ridy等[4]局部应用脂质体盐酸利多卡因延长了利多卡因麻醉起效时间,也明显增加麻醉持续时间。有研究证实脂质体局部药物传送系统传送药物至局部组织,局部组织的浓度较高且持续时间长,而血中没有检测到该药物[5][6]。本研究结果显示鬼臼毒素酊剂的AUC是脂质体制剂的2.3倍,并且脂质体制剂的血药峰值浓度显著低于鬼臼毒素酊剂的血药峰值浓度($P < 0.001$),提示脂质体鬼臼毒素制剂能使鬼臼毒素在皮肤内缓慢释放,与以往的研究结论相符。既然鬼臼毒素酊剂在临床上广泛用于治疗尖锐湿疣,而且我们研制的脂质体鬼臼毒素外用后的血药浓度远远低于鬼臼毒素酊剂,那么用脂质体鬼臼毒素治疗尖锐湿疣也应该是安全的。初步临床研究显示脂质体鬼臼毒素毒副作用明显减少[7]。Wang等[8]的研究认为脂质体作为靶向性药物载体,促进了药物选择性聚集在肿瘤组织,并且药物浓度最高,肿瘤周围的皮肤和肌肉药物浓度也较高,而脑中药物浓度较低或不能检测到。本实验结果显示脂质体鬼臼毒素混悬液外用的血药浓度明显低于普通鬼臼毒素酊剂,与他们的研究结果一致。

本研究为脂质体鬼臼毒素临床应用提供了动物实验依据,但其外用后在皮肤层的分布及血液吸收后在各器官的分布差异等尚有待进一步研究。

(责任编辑:黄开颜)

参考文献:

- [1] 马守栋,李国锋,陈志良,等.脂质体鬼臼毒素的制备及质量研究[J].中国药业,1997,6(5):12-3.
- [2] Greenberg MD, Rutledge LH, Reid R, et al. A double-blind, randomized trial of 0.5% podofilox and placebo for the treatment of genital warts in women[J]. Obstet Gynecol, 1991, 77(5): 735-9.
- [3] 李国锋,许重远,孟庆礼,等.鬼臼毒素具有荧光性[J].第一军医大学学报,1996,16(3):268-9.
- Li GF, Xu CY, Men QL, et al. The fluorescence of podophyllotoxin[J]. J First Mil Med Univ, 1996, 16(3): 268-9.
- [4] El-Ridy MS, Khalil RM. Free versus liposome-encapsulated lignocaine hydrochloride topical applications[J]. Pharmazie, 1999, 54(9): 682-4.
- [5] Waldrep JC, Gilbert BE, Knight CM, et al. Pulmonary delivery of beclomethasone liposome aerosol in volunteers: tolerance and safety[J]. Chest, 1997, 111(2): 316-323.
- [6] Waldrep JC, Gilbert BE, Mehta K. Aerosol delivery of liposomal all-trans-retinoic acid to the lungs[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 43(4): 277-83.
- [7] 曾抗,李国锋,许重远,等.脂质体鬼臼毒素软膏治疗尖锐湿疣的双盲随机对照试验[J].第一军医大学学报,1998,18(3):246.
- [8] Wang ZJ, He YY, Huang CG, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and photodynamic therapy efficacy of liposomal-delivered hypocrellin A, a potential photosensitizer for tumor therapy[J]. Photochem Photobiol, 1999, 70(5): 773-80.

参考文献:

- [1] 马守栋,李国锋,陈志良,等.脂质体鬼臼毒素的制备及质量研究[J].中国药业,1997,6(5):12-3.
- [2] Greenberg MD, Rutledge LH, Reid R, et al. A double-blind, randomized trial of 0.5% podofilox and placebo for the treatment of genital warts in women[J]. Obstet Gynecol, 1991, 77(5): 735-9.
- [3] 李国锋,许重远,孟庆礼,等.鬼臼毒素具有荧光性[J].第一军医大学学报,1996,16(3):268-9.

Li GF, Xu CY, Men QL, et al. The fluorescence of podophyllotoxin[J]. J First Mil Med Univ, 1996, 16(3): 268-9.

[4] El-Ridy MS, Khalil RM. Free versus liposome-encapsulated lignocaine hydrochloride topical applications[J]. Pharmazie, 1999, 54(9): 682-4.

[5] Waldrep JC, Gilbert BE, Knight CM, et al. Pulmonary delivery of beclomethasone liposome aerosol in volunteers:tolerance and safety[J]. Chest, 1997, 111(2): 316-323.

[6] Waldrep JC, Gilbert BE, Mehta K. Aerosol delivery of liposomal all- trans-retinoic acid to the lungs[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 43(4): 277-83.

[7] 曾抗, 李国锋, 许重远, 等. 脂质体鬼臼毒素软膏治疗尖锐湿疣的双盲随机对照试验[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(3): 246.

[8] Wang ZJ, He YY, Huang CG, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and photodynamic therapy efficacy of liposomal-delivered hypocrellin A, a potential photosensitizer for tumor therapy[J]. Photochem Photobiol, 1999, 70(5): 773-80.

[回结果列表](#)