

## 氚标记吲哚美辛在荷瘤鼠血液及瘤体内的药代动力学研究

董 薇<sup>1</sup>, 张彩霞<sup>1</sup>, 杜晓明<sup>2</sup>, 陈春梅<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学 附属第二医院核医学科, 辽宁 沈阳 110001;

2. 中国医科大学 附属第二医院临床药理研究室, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要:** 研究氚标记吲哚美辛(<sup>3</sup>H-IN)在荷瘤小鼠血液及瘤体内的分布及药代动力学特征, 进一步探讨其在肿瘤中的蓄积现象。荷 Lewis 肺癌小鼠灌胃给药后于不同时间点取血和瘤组织, 分别测定其放射性计数及药物浓度。结果表明,<sup>3</sup>H-IN 蓄积于肿瘤组织中, 并以较高水平维持较长时间, 在此期间, 瘤体中吲哚美辛药物原形则迅速消除, 且浓度远低于血药浓度。小鼠血浆和瘤体内不同时相 IN 的药物浓度数据用 DAS ver1.0 实用药代动力学程序处理, 选择二室模型, 且权重系数为 1/cc 拟合药-时曲线, 得出主要药代动力学参数。结果提示,<sup>3</sup>H-IN 有很好的瘤组织趋向性, 其药物原形并非在肿瘤中蓄积的主要成分。

**关键词:** 氚标记; 吲哚美辛; Lewis 肺癌; 药代动力学

中图分类号: R817-33; R817.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-7512(2007)01-0041-04

## Study on Pharmacokinetics of <sup>3</sup>H-IN in Tumor-bearing Mice's Blood and Tumor

DONG Wei<sup>1</sup>, ZHANG Cai-xia<sup>1</sup>, DU Xiao-ming<sup>2</sup>, CHEN Chun-mei<sup>1</sup>

(1. No. 2 Affiliated Hospital, China Medical University Department of Nuclear Medicine, Shenyang 110001, China;

2. No. 2 Affiliated Hospital, China Medical University Laboratory of Clinical Pharmacology, Shenyang 110001, China)

**Abstract:** Pharmacokinetics of <sup>3</sup>H-IN in tumor-bearing Mice's blood and tumor are studied, and the accumulated phenomenon of IN in tumor are further discussed. Blood and tumor of mice are taken at different time after being taken <sup>3</sup>H-IN orally, radioactivities are counted and concentrations of IN are measured in the tissues. The results show that <sup>3</sup>H-IN accumulate in tumor tissue with high levels for a long time, but at the same time IN prototype is cleared rapidly and it's concentrations are far lower than in blood. Pharmacokinetic parameters are calculated by DAS ver1.0 software. The results demonstrate that <sup>3</sup>H-IN has good affinity to the tumor tissue and the major part accumulated in tumor is not the IN prototype.

**Key words:** <sup>3</sup>H-labeled; indomethacin; lewis lung cancer; pharmacokinetics

吲哚美辛(indomethacin IN)是临床使用较久的非甾体类抗炎免疫药物。有文献<sup>[1,2]</sup>报道,

将氚标记的吲哚美辛引入到荷瘤小鼠体内, 有很强的肿瘤亲和性。为进一步研究吲哚美辛在瘤

体内的代谢分布及其在肿瘤中的蓄积作用,为其在临床上的进一步应用提供理论依据,本工作拟将氚标记吲哚美辛( $^3\text{H-IN}$ )引入到荷 Lewis 肺癌小鼠体内。关于吲哚美辛在人体血浆及动物血浆和组织中药代动力学及吲哚美辛抗肿瘤机制研究的文献国内外已有较多报道<sup>[3-6]</sup>,但关于吲哚美辛在荷瘤小鼠血浆及瘤体内的药代动力学及在肿瘤组织中蓄积的主要成分的研究国内外尚未见报道。以往研究的方法单一<sup>[7-9]</sup>,放射性核素示踪技术虽有灵敏度较高的优点,但它只能测定核射线,而不能测知被指定化学结构的示踪物质,高效液相色谱技术正是弥补了此项不足,它能通过必要的分离与制样测定指定化学结构物质的药物浓度。本研究拟应用液体闪烁测量(LSC)技术和高效液相色谱(HPLC)分析技术研究氚标记吲哚美辛( $^3\text{H-IN}$ )在荷瘤鼠血液及瘤体内的分布和药代动力学特征,及其在肿瘤组织中的蓄积现象。

## 1 实验材料

### 1.1 主要仪器

LS580/全自动液闪测定仪:美国 Beckmen 公司生产;LC-10AT 高效液相色谱仪,附 SPD-10A 可见紫外检测器和 C-R6A 数据处理机;日本岛津公司产品;SC1100 通用色谱工作站;XW-80A 型旋涡混合器;上海精科实业有限公司;LD4-2A 离心机;上海医用分析仪器厂;TG332A 型微量分析天平;上海天平仪器厂。

### 1.2 主要材料与试剂

吲哚美辛:化学纯度 100%,中国医科大学二院制药厂产品; $^3\text{H-IN}$ :放化纯度 $>95\%$ ,比活度 $>185\text{ GBq/g}$ ,由中国原子能科学研究院同位素研究所氚标记实验室标记;闪烁液:2,5-二苯基恶唑(PPO)(香港)、1,4-双[2-(5-苯基恶唑)]-苯(POPOP)(德国)、萘、AR 级二甲苯、无水乙醇、内标物萘普生钠;甲醇及乙腈为色谱纯(天津市四友生物医学技术有限公司);其余试剂均为分析纯。

### 1.3 实验动物

$\text{C}_{57}\text{BL}/6$  近交系雄性小鼠:66 只,鼠龄 6~8 周,体重  $20 \pm 2\text{ g}$ ,购于中国医科大学实验动物中心,使用许可证号 XYXK(辽)2003-0019,生产许可证 XCXK(辽)2003-0013;荷 Lewis 肺癌模型鼠:购自中国医学科学院药物研究所。

## 2 实验方法

### 2.1 鼠 Lewis 肺癌模型制备

将荷 Lewis 肺癌模型鼠处死,暴露肿瘤,取 5 g 生长良好的肿瘤组织,用研磨器磨碎,加 15 mL 生理盐水稀释。用注射器将瘤液接种于  $\text{C}_{57}\text{BL}/6$  近交系小鼠右前腋部皮下,每只接种 0.2 mL(单细胞悬液数为  $10^7/\text{mL}$ )。待接种部位肿瘤长至长径 0.8~1.0 cm 时备用。

### 2.2 液体闪烁法测量 $^3\text{H-IN}$ 在荷瘤鼠血浆及肿瘤内的分布

将 66 只荷瘤鼠编号后,随机分成 11 组,每组 6 只。第 1 组小鼠作为对照组不做处理,其他各组按每只 185 kBq(0.2 mL,含 IN 90  $\mu\text{g}$ ) $^3\text{H-IN}$  灌胃。于 0.5、1、2、3、4、6、9、12、24、36、48 h 取眼血并处死小鼠,取出肿瘤组织,用生理盐水洗净表面浮血,滤纸吸干,称湿重,分别匀浆,再加入硝酸进行消化后均匀平铺于滤过膜上晾干。将上述收集的血液及肿瘤组织依次放入液闪瓶内测定放射性计数率,并计算每克组织的放射性摄取百分数( $\% \cdot \text{g}^{-1}$ )。

### 2.3 高效液相色谱分析

**2.3.1 样品制作** 血浆样品的制作:在进行荷瘤鼠液闪测量取材的同时,用涂有肝素的锥形管收集 1 mL 血液,以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,置  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中待测。肿瘤组织匀浆样品的制作:将 2.2 节取出的瘤组织用滤纸吸干水分、称重,置组织研磨器中,以体积比为 1:3 加入生理盐水,研磨成组织匀浆,同样以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,置  $20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱待测。

**2.3.2 吲哚美辛标准曲线的制作** 用精密天平称取 25 mg IN,用容量瓶定容到 25 mL 制成 1 g/L 贮备液,再用甲醇稀释成浓度 50、25、10、5、2.5、1.25、0.5 mg/L,共 7 个浓度梯度,每个浓度各取 50  $\mu\text{L}$ ,分别加入 50  $\mu\text{L}$  内标(10 mg/L 萘普生钠溶液),再各加入 0.1 mL 对照组的血浆或肿瘤组织样品,混匀后分别加入 100  $\mu\text{L}$  10%磷酸二氢钾缓冲液(pH 为 2.5),再分别加入 3 mL 甲基叔丁基醚充分混合,振荡 20 min,3 500r/min 离心 10 min,取上清液,至  $60\text{ }^\circ\text{C}$  水浴空气吹干,残渣用 100  $\mu\text{L}$  无水甲醇溶解后,涡旋 1 min,取 50  $\mu\text{L}$  进行高效液相色谱分析。以 IN 浓度为横坐标,所测得的各浓度点血浆或瘤组织匀浆中 IN 与内标萘普生钠的色谱峰高比

值为纵坐标做成吲哚美辛的标准曲线, 并进行线性回归。

**2.3.3 血浆及瘤组织中药物浓度测定** 各取无水甲醇  $50 \mu\text{L}$ , 用以补充 IN 标准溶液体积, 分别加入  $50 \mu\text{L}$  内标 ( $10 \text{ mg/L}$  萘普生钠溶液), 再各加入待测血浆及瘤组织样品  $0.1 \text{ mL}$  进行混匀, 余方法均同 2.3.1, 将测得的各时间点血浆及瘤组织中 IN 与内标萘普生钠的色谱峰高比值代入标准曲线的回归方程, 从而得出各时间点的药物浓度。

## 2.4 统计学处理

所有计量结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本均数比较采用  $t$  检验。检验水平  $P = 0.01, P < 0.05$  为显著;  $P < 0.01$  为极显著。血浆及瘤体内不同时相的药物浓度数据用 DAS ver1.0 实用药代动力学程序处理, 选择二室模型且权重系数为  $1/cc$  拟合药-时曲线。

## 3 结果与讨论

### 3.1 $^3\text{H-IN}$ 在荷瘤鼠血液及组织内的生物分布

$^3\text{H-IN}$  在荷瘤小鼠血液及瘤组织内的生物分布列于表 1。表 1 结果显示,  $^3\text{H-IN}$  在瘤组织内有较多的代谢分布, 4 h 达高峰, 此后清除速率明显慢于血液, 以 6~12 h 排泄最为缓慢, 于给药后 6、9 h 荷瘤鼠的每克瘤组织放射性占服药总剂量的百分数明显高于血液,  $P < 0.05$ ; 12 h 时, 肿瘤与血液中的放射性分布有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 肿瘤与血液的放射性摄取比在 3 h 时开始  $> 1$ , 并随时间延长而逐渐增加, 12 h 时达到最大, 与文献<sup>[1]</sup>报道结果基本相符。这表明  $^3\text{H-IN}$  在荷瘤鼠的肿瘤组织中有明显的放射性浓聚, 且能够在肿瘤组织中保持较长时间。已有药效学研究证明<sup>[2]</sup>, IN 有较强的抑制肿瘤作用, 故 IN 长时间浓聚于肿瘤组织中为其抗肿瘤作用提供了充分的基础。

### 3.2 血浆及瘤组织中 $^3\text{H-IN}$ 的 HPLC 测量结果

**3.2.1 血浆及瘤组织的 HPLC 谱图** 血浆及瘤组织的 HPLC 分谱图分别示于图 1 和图 2。由图 1 和图 2 可以看出, 血浆中 IN、内标萘普生钠和溶剂杂质峰的保留时间分别约为 4.302、2.825 和 1.45 min, 瘤组织中分别为 4.727、3.480 和 1.90 min。

**3.2.2 IN 标准曲线** IN 标准曲线示于图 3。该标准曲线的相关系数  $r$  为 0.999 4。回归方程

为  $y = 0.0004924x + 0.063975$ 。

**3.2.3 血浆及瘤组织中 IN 的药物浓度-时间曲线** 血浆及瘤组织中 IN 的药物浓度-时间曲线示于图 4。图 4 显示, IN 原形药物在肿瘤组织内 4 h 时达高峰  $9.77 \text{ mg/L}$ , 而后消除迅速, 并未出现蓄积, 6 h 时浓度为  $3.06 \text{ mg/L}$ , 9 h、12 h 时浓度分别为  $1.72 \text{ mg/L}$  和  $1.30 \text{ mg/L}$ , 至 36 h、48 h 时几乎测不出药物浓度, 6~12 h 时肿瘤组织中的原形药物浓度远低于血液浓度, 两者间有极显著的差异 ( $P < 0.01$ )。与液闪测量结果相比较, 两者在肿瘤组织中均于 4 h 达高峰浓度,

表 1  $^3\text{H-IN}$  在荷瘤小鼠瘤体及血液中的生物分布 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

时间/h	放射性摄取/(%·g <sup>-1</sup> )		P <sup>1)</sup>
	瘤组织	血浆	
0.5	0.16±0.27	0.58±0.26 <sup>1)</sup>	< 0.05
1.0	0.36±0.29	0.31±0.23	> 0.05
2.0	0.38±0.05	0.45±0.27	> 0.05
3.0	0.47±0.26	0.43±0.09	> 0.05
4.0	0.68±0.33	0.36±0.01	> 0.05
6.0	0.39±0.11	0.18±0.26 <sup>1)</sup>	< 0.05
9.0	0.36±0.06	0.16±0.22 <sup>1)</sup>	< 0.05
12.0	0.34±0.03	0.08±0.11 <sup>2)</sup>	< 0.01
24.0	0.13±0.06	0.06±0.02	> 0.05
36.0	0.09±0.02	0.04±0.12	> 0.05
48.0	0.06±0.24	0.01±0.02	> 0.05

注: 1) 瘤体与血液比较

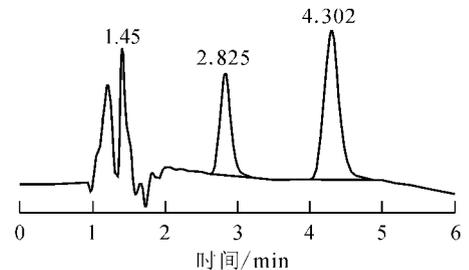


图 1 服药后 12 h 血浆的 HPLC 谱图

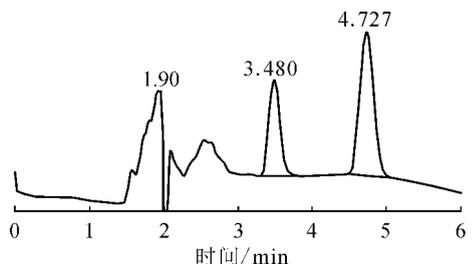


图 2 服药后 6 h 瘤组织的 HPLC 谱图

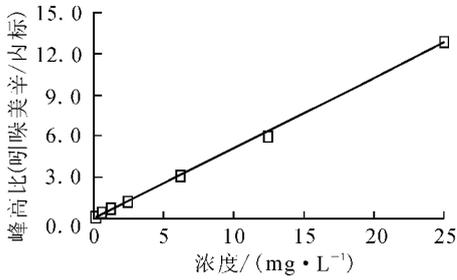


图 3 吲哚美辛标准曲线

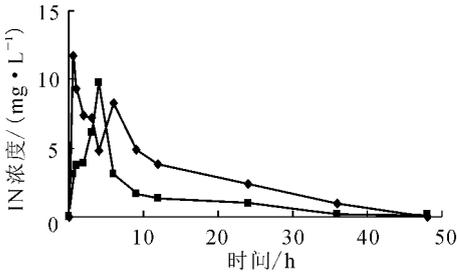


图 4 荷瘤鼠血浆及瘤体内的 IN 浓度

而后<sup>3</sup>H-IN 清除缓慢,以 6~12 h 最缓慢;而在此期间 IN 原形药物则清除迅速。这表明荷瘤小鼠服药后 6~12 h 在肿瘤组织中蓄积的主要成分并非 IN 的药物原形,可能是其 I 相(DMI 和 DBI)或 II 相(葡醛酸结合反应物)代谢产物中的一种或是其几种代谢物质的混合物。

**3.2.4 <sup>3</sup>H-IN 在血浆及瘤体内的药代动力学参数** <sup>3</sup>H-IN 在血浆及瘤体内的分布半衰期  $T_{1/2\alpha}$  分别为 0.574 8 h 和 3.163 9 h;消除半衰期  $T_{1/2\beta}$  分别为 15.110 4 h 和 11.555 2 h;峰时曲线下面积  $AUC_{0-\infty}$  分别为 108.812 6 mg/(L·h) 和 43.006 0 mg/(L·h);清除率  $CL/F$  分别为 0.018 6 L/(h·kg) 和 0.021 6 L/(h·kg);表观分布容积为 0.405 2 L·kg<sup>-1</sup> 和 0.232 4 L·kg<sup>-1</sup>。

### 3 结论

本研究应用液体闪烁测量(LSC)技术和高效液相色谱(HPLC)分析技术观察了 IN 的肿瘤趋向性,获得了吲哚美辛在荷瘤小鼠血浆及瘤体内的药物浓度及药代动力学参数,表明 IN 原形药物并非在肿瘤中蓄积的主要成分,可能是其 I 相(DMI 和 DBI)或 II 相(葡醛酸结合反应物)代谢产物中的一种或是其几种代谢物质的混合物,有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 周丽坤,张彩霞. 氚标记吲哚美辛的亲肿瘤实验研究[J]. 中华核医学杂志, 2004, 24(4): 209.
- [2] 张彩霞,徐微娜,周丽坤. 氚示踪法研究吲哚美辛在 C<sub>57</sub>小鼠体内的分布及其抗肿瘤作用[J]. 同位素, 2004, 1(4): 214-217.
- [3] REMMEL RP, CREWS BC, KOZAK KR, et al. Studies on the Metabolism of the Novel, Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor Indomethacin Phenethylamide in Mouse, Mouse, and Human Liver Microsomes: Identification of Active Metabolites [J]. Drug Metabolism and Disposition, 2004, 32: 113-122.
- [4] 曹德善,刘丽萍,王广基. 吲哚美辛缓释片的研制及生物利用度的研究[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(5): 383-387.
- [5] YAMADA I, NAGAMATSU Y, IMAYOSHI T, et al. Pharmacokinetic Behaviour in Polymorphonuclear Leucocytes of N,N-dimethylcarbamoylmethyl-alpha, 2-dimethyl-5H-[1]benzopyran o [2,3-b]-pyridine-7-acetate (Y-23023), a New Prodrug Type of Anti-inflammatory Agent, and Indomethacin After Oral Administrations in Rats [J]. Pharmacol, 1994, 46(7): 614-616.
- [6] LIU S, KAMIJO M, TAKAYASU T, et al. Direct Analysis of Indomethacin in Rat Plasma Using a Column-switching High-performance Liquid Chromatographic System [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 767(1): 53-60.
- [7] LI YC, GUAN CT. Pharmacokinetics of Lactosaminated Recombinant Human Growth Hormone in Mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(5): 450.
- [8] WANG CH, FENG YP, WU YL. A Study on the Metabolites of Di-3-n-butylphthalide in Mice [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1997, 32(9): 641-646.
- [9] VREE TB, Vanden BIGGELAAR-MARTEA M, VERWEY-BAN WISSEN CP. Determination of Indomethacin, Its Metabolites and Their Glucuronides in Human Plasma and Urine by Means of Direct Gradient HPLC Analysis; Preliminary Pharmacokinetics and Effect of Probenecid [J]. J Chromatogr, 1993, 616(2): 271-282.