

二氢卟吩 e6 脂质体在荷瘤小鼠体内的药动学及靶向性分析

张祚德¹, 王安元¹, 郝建冬², 谢波^{3*}, 凌家俊^{1*}, 朱海媚¹, 贺怡¹, 田金洁¹

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广州意斯生物工程科技有限公司, 广州 510070;
3. 广州军区广州总医院, 广州 510010)

[摘要] 目的:研究二氢卟吩 e6 (Ce6) 磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液及其脂质体在荷瘤小鼠体内的药物动力学特性,并验证 Ce6 脂质体的肝脏靶向性和肿瘤靶向性。方法:荷瘤小鼠尾静脉注射 Ce6 溶液或其脂质体后,通过 HPLC 测定不同时间点血浆及组织中 Ce6 的质量浓度,流动相乙腈-0.2% 磷酸盐 (50:50),检测波长 403 nm。采用 DAS 2.1.1 软件计算药动学参数,以 8 h 内相对摄取率 (RE) 来评价 Ce6 对主要器官的靶向性。结果:Ce6 溶液和 Ce6 脂质体在荷瘤小鼠血浆中的药动学模式均符合二室模型,分布相半衰期 ($t_{1/2\alpha}$) 分别为 1.516, 0.507 h;消除相半衰期 ($t_{1/2\beta}$) 分别为 0.457, 1.366 h;清除率 (CL) 分别为 0.178, 0.067 L·h⁻¹·kg⁻¹;药时曲线下面积 (AUC_{0-∞}) 分别为 16.734, 51.475 mg·h·L⁻¹。在肝、脾、肿瘤组织中,RE 分别为 1.149, 1.477 和 1.277。经统计学分析,Ce6 溶液和 Ce6 脂质体的药动学结果有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论:Ce6 脂质体在体内的药物代谢清除速度更缓慢,分布更迅速、广泛,并能选择性聚集于肝脏和肿瘤组织。Ce6 脂质体制剂可继续开发以用于治疗肝癌。

[关键词] 二氢卟吩 e6; 脂质体; 药代动力学; 靶向性; 组织分布; 荷瘤小鼠; 相对摄取率

[中图分类号] R22;R289;R283.6;R284;R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0071-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181203

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180327.1322.013.html>

[网络出版时间] 2018-03-27 14:18

Pharmacokinetics and Targetability of Chlorin e6 Liposomes in Tumor-bearing Mice

ZHANG Zuo-de¹, WANG An-yuan¹, HAO Jian-dong², XIE Bo^{3*}, LING Jia-jun^{1*},
ZHU Hai-mei¹, HE Yi¹, TIAN Jin-jie¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. EEC Bio-tech (Guangzhou) Co. Ltd., Guangzhou 510070, China;
3. General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the pharmacokinetics of chlorin e6 (Ce6) phosphate-buffered saline (PBS) solution and its liposomes in tumor-bearing mice, and to verify the liver and tumor targeting of Ce6 liposomes. **Method:** After Ce6 solution or its liposomes were injected into tail vein of tumor-bearing mice, at different time points, the drug concentrations in serum and tissues of tumor-bearing mice were determined by HPLC, and the pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.1.1 software, while the relative uptake rate (RE) within 8 h was adopted to calculate the targeting performance of Ce6 on the main organs. **Result:** The pharmacokinetic models of Ce6 solution and its liposomes in plasma of tumor-bearing mice were consistent with the two-compartment model, their half time of distribution phase ($t_{1/2\alpha}$) were 1.516 h and 0.507 h; their half time of

[收稿日期] 20170930(005)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014A020210022)

[第一作者] 张祚德,在读硕士,从事新剂型与新技术研究,E-mail:zdz815680232@foxmail.com

[通信作者] * 谢波,副主任医师,硕士生导师,从事肿瘤靶向治疗技术研究,Tel:020-88654502,E-mail:xiabo72@tom.com;

* 凌家俊,教授,硕士生导师,从事现代药物制剂及药代动力学研究,Tel:020-39358043,E-mail:ljj@gzucm.edu.cn

elimination phase ($t_{1/2\beta}$) were 0.457 h and 1.366 h; clearance rates (CLs) were 0.178, 0.067 L·h⁻¹·kg⁻¹; their AUC_{0-∞} were 16.734, 51.475 mg·h·L⁻¹, respectively. In liver, spleen and tumor tissues, the RE values were 1.149, 1.477 and 1.277, respectively. The statistical analysis showed that there was a significant difference in major pharmacokinetic parameters between Ce6 solution and Ce6 liposomes ($P < 0.05$). **Conclusion:** Compared with Ce6 solution, Ce6 liposomes has a more slowly metabolic clearance *in vivo*, and it distributes more rapidly and widely, it also can selectively assemble in liver and tumor tissue, liposomal formulations of Ce6 may be further developed for the treatment of liver cancer.

[**Key words**] chlorin e6; liposomes; pharmacokinetics; targetability; tissue distribution; tumor-bearing mice; relative uptake rate

二氢卟吩 e6 (Ce6) 是一种有优良光敏特性和声敏特性的叶绿素降解产物^[1], 其具有治疗多种肿瘤的药理作用, 如肺癌、乳腺癌、肝癌、黑色素瘤等^[2-5], 且具有无毒、肿瘤组织选择性高、非肿瘤组织清除率较高等优点^[6], 这使其成为了声动力疗法中最具发展前景的第二代新型声敏剂。目前 Ce6 在光动力治疗癌症中已取得了较好的疗效, 尤其在治疗黑色素瘤方面, 其已在美国、加拿大等国被批准作为一种光动力诊断和治疗皮肤及黏膜类恶性肿瘤的药物使用。而在声动力治疗方面, 目前学者们多以游离形式给药来研究 Ce6 的抗肿瘤等药理作用, 但对于二氢卟吩 e6 的制剂学研究报道很少, 游离形式的 Ce6 虽然本身具有一定程度选择性聚集在肿瘤细胞和其他不正常细胞中的特性^[7], 但 Ce6 以游离形式进入体内之后, 仍有部分分布于正常细胞和组织中, 其受超声波激发后, 可能会导致机体正常细胞在治疗过程中受损而出现声毒副作用; 同时根据相关文献报道^[8-11], 发现以游离形式给药后 Ce6 虽然在肿瘤组织具有选择性好等优点, 但也存在在体内的半衰期特别短、在心脏中浓度高、生物利用度较低等缺点, 故研究一种能通过改变药物的分布来有效降低抗肿瘤药物的毒副作用并提高治疗指数的靶向制剂很有必要。

脂质体、纳米微球、纳米乳等靶向给药系统是目前抗肿瘤药物载体研究的主要发展方向。由于声动力疗法的作用机制是超声波直接作用于肿瘤部位, 诱发肿瘤组织中的声敏剂产生抗肿瘤作用, 故期望声敏剂能高度选择性聚集于肿瘤组织, 同时为了延长药物在体内的滞留时间, 提高其生物利用度。基于本课题组的前期研究基础^[9-11]及现有实验条件的考虑, 选择采用薄膜分散法将 Ce6 制备成纳米脂质体制剂^[12]。脂质体系指将药物包封于以磷脂和胆固醇为原料所形成的类脂质双分子层内而形成的微型泡囊体。其具有良好的组织相容性、细胞亲和性、

靶向性、缓释性等特性^[13], 进入体内主要被机体的网状内皮系统吞噬而激活机体自身的免疫功能, 并改变被包封药物的体内分布, 使药物主要在肝、脾、肺和骨髓等组织中积蓄, 从而提高药物的治疗指数、减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性。为了评价 Ce6 纳米脂质体的肝脏靶向性和肿瘤靶向性等效果 (与 Ce6 溶液剂相比), 本实验拟通过建立小鼠皮下肿瘤模型^[14], 利用高效液相色谱法^[15]测定药物浓度来探讨荷瘤小鼠体内的药动学特征和药物在各主要组织及肿瘤组织的分布规律^[16], 以期 Ce6 脂质体的后续剂型改进、声动力疗法临床治疗不同部位肿瘤时超声辐照时间点的选择等提供参考。

1 材料

2487 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), JEM-1400 型透射电镜 (日本 JEOL 公司), Zatasize 1000HSA 型激光散射粒径仪 (英国 Malvern 仪器有限公司), UV-2100 型紫外-可见分光光度仪 (上海尤尼柯仪器有限公司), AUW120D 型电子分析天平 (日本岛津公司), XDS-20 型倒置生物显微镜 (上海炳宇光学仪器有限公司), 雷磁 PHS-25 型 pH 计 (上海精科实业有限公司), JY92-2D 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), R2205 型旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司), TG1650-WS 型离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司), T10 基本型电动匀浆机 (德国 IKA 公司), CT14RD 型冷冻离心机 (上海天美科学仪器有限公司)。

二氢卟吩 e6 (Ce6) 对照品 (批号 VY08-595, 纯度 > 95%) 和 Ce6 原料药 (批号 VY08-595, 纯度 > 95%) 均购自广州意斯生物工程科技有限公司, 大豆卵磷脂 (上海太伟药业股份有限公司), 曲拉通 X-100 (天津市登峰化学试剂厂), 胆固醇和交联葡聚糖凝胶 G-50 (Sephadex G-50) 均购自上海蓝季科技发展有限公司, 小鼠 H22 肝癌细胞株 (广州中医药大学细胞库), 水为超纯水, 甲醇和乙腈为色谱纯,

其余试剂均为分析纯。

SPF级健康昆明种小鼠,雌雄各半,体质量18~22 g,购自广州中医药大学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2008-0020。本实验经广州中医药大学动物伦理委员会批准,批准号B2015-051-03。

2 方法与结果

2.1 Ce6脂质体的制备^[12] 精密称取处方量大豆卵磷脂、胆固醇和Ce6,加入适量三氯甲烷-甲醇(5:1)混合溶剂使其完全溶解,置于250 mL茄形瓶中,于旋转蒸发仪上40℃减压旋转蒸发(200 r·min⁻¹)除去混合溶剂以形成均匀干燥薄膜,加水10 mL,将薄膜洗脱并水化(45℃,30 min)成含药脂质体混悬液,依次用孔径为0.8,0.45,0.22 μm的微孔滤膜挤压过膜,即得。处方信息为药脂比1:40,大豆卵磷脂-胆固醇(4:1),水化介质为水。

2.2 脂质体的粒径检测、形态观察、包封率测定

2.2.1 粒径 制得的Ce6脂质体混悬液为均一、稳定的半透明绿色分散体系,利用Zetasize 1000HSA型激光散射粒径仪测定,结果该脂质体平均粒径105.7 nm。

2.2.2 形态 取稀释后的Ce6脂质体溶液1滴,滴加在碳膜铜网上,用滤纸吸去多余的液滴,自然晾干,在透射电子显微镜(TEM)下观察Ce6脂质体的形态,其呈表面光滑的球形,粒子无粘连、大小较均匀。

2.2.3 包封率 采用葡聚糖凝胶柱色谱法。在不断搅拌下缓缓将经水溶胀12 h的Sephadex G-50加入底部装有筛板的玻璃柱(15 mm×300 mm),排除气泡,用水以0.67 mL·min⁻¹的流速冲洗平衡后即得凝胶柱。精密吸取Ce6脂质体混悬液0.2 mL加于Sephadex G-50凝胶柱顶部,用水以2/3 mL·min⁻¹的流速洗脱,收集脂质体部分洗脱液至25 mL棕色量瓶中,用10%曲拉通X-100溶液破乳并定容,摇匀后精密吸取该溶液20 μL进样测定,计算被包封药物Ce6的浓度(C₁);另精密移取Ce6脂质体混悬液0.2 mL,用10%曲拉通X-100破乳并定容,摇匀后同法测定,计算混悬液中游离的和被包封的Ce6总浓度(C₀)。根据公式包封率 = C₁/C₀ × 100%计算脂质体平均包封率93.0%。

2.3 色谱条件 采用Agilent HC-C₁₈ ODS色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相乙腈-0.2%磷酸水溶液(50:50),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温25℃,检测波长设定403 nm。在此色谱条件下,Ce6保留时间约6.7 min,峰形良好,无杂峰干扰。

2.4 对照品储备液的制备 精密称取Ce6对照品1.50 mg,置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为150 mg·L⁻¹的Ce6对照品储备液,于冰箱中4℃存放。

2.5 动物试验

2.5.1 昆明小鼠皮下肿瘤模型的建立^[11] 将冻存的H22肝癌细胞复苏,用生理盐水洗涤3次,用75%乙醇消毒昆明种小鼠腹部后腹腔注射瘤细胞生理盐水悬液0.2 mL,接种后原代培养,8 d后待腹水呈淡黄色,用无菌注射器从H22荷瘤小鼠腹腔中抽取腹水,用75%乙醇消毒小鼠腹部,吸取腹水,加3倍量生理盐水稀释腹水,即接种到第2批昆明小鼠中,进行传代培养,同法传至3代后无菌条件下抽取H22荷瘤小鼠的腹水(黄色清亮液体),于3 000 r·min⁻¹离心1 min,弃上清液后用无菌生理盐水洗涤3次,用无菌生理盐水调至细胞密度为2×10⁶个/mL的肿瘤细胞悬液。每只小鼠左前肢皮下接种肿瘤细胞悬液0.2 mL,共接种80只。接种后,SPF条件下饲养约10 d,小鼠左前肢皮下即能长出直径>10 mm的颜色鲜艳、表皮无溃烂的肿瘤。

2.5.2 动物分组 挑选出肿瘤直径>10 mm的荷瘤小鼠78只,随机分组,雌雄各半。A和B两组各36只,C组6只。给药前禁食12 h,自由饮水。A组给予Ce6溶液(将Ce6溶于pH 7.4的0.01 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液中,即得),B组给予Ce6脂质体混悬液,给药方式均为尾静脉注射,剂量按Ce6计算均为3.75 mg·kg⁻¹,C组不给药。A和B两组分别于给药后15,30,60,120,240,480 min眼眶取血(每个时间点随机取6只,雌雄各半),脱颈椎处死,迅速剖取心、肝、脾、肺、肾各脏器及肿瘤组织,用生理盐水冲去血污,滤纸吸干水分,精密称定质量。全血置于肝素化离心管中,离心(5 000 r·min⁻¹,10 min)得血浆(上清液),于-20℃低温保存备用。C组眼眶取完血后直接处死,剖取心、肝、脾、肺、肾各脏器及肿瘤组织后,其全血及各组织按照给药组处理方法处理,即得空白血浆和各空白组织。

2.6 样品的处理

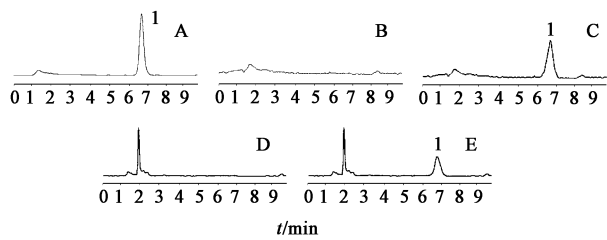
2.6.1 血浆样品 将空白血浆及各给药组血浆样品分别解冻,摇匀,精密量取血浆100 μL,加入含10%曲拉通X-100的甲醇溶液400 μL,涡旋5 min,静置5 min后离心(12 000 r·min⁻¹,10 min),吸取上清液,经0.22 μm微孔滤膜滤过,待测。

2.6.2 组织样品 将空白及给药荷瘤小鼠已称重

的心、肝、脾、肺、肾各脏器及肿瘤组织分别置匀浆器内,加入 5 倍量 0.9% NaCl 溶液进行匀浆,取组织匀浆液 0.2 mL,加入含 10% 曲拉通 X-100 的甲醇溶液 0.8 mL,涡旋 5 min,后续步骤同 2.6.1 项。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性考察 分别吸取空白血浆样品、空白肿瘤组织样品各 20 μL ,按 2.3 项下色谱条件进样检测,得血浆和肿瘤组织的阴性色谱图;分别吸取空白血浆样品和空白肿瘤组织样品各 90 μL ,分别加入 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ce6 对照品溶液 10 μL ,混匀后各吸取 20 μL 进样,得血浆和肿瘤组织样品含药色谱图,见图 1。结果表明该方法专属性良好。



A. 对照品; B. 空白血浆; C. 空白血浆 + 对照品; D. 空白肿瘤组织; E. 空白肿瘤组织 + 对照品; 1. Ce6

图 1 二氢卟吩 e6 样品的 HPLC

Fig. 1 HPLC of sample of chlorin e6

2.7.2 线性关系考察 取空白血浆样品和各空白组织样品,分别加入适量 Ce6 对照品储备液(质量浓度 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),用甲醇配成质量浓度依次为 0.013, 0.016, 0.078, 0.130, 0.265, 1.300, 2.650, 5.200, 8.632 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列溶液,按 2.3 项下色谱条件测定。以峰面积为纵坐标,Ce6 的质量浓度为横坐标,进行线性回归分析,得线性回归方程和相关系数,见表 1。

表 1 Ce6 在荷瘤小鼠血浆及不同组织中的标准曲线

Table 1 Standard curves of Ce6 in plasma and different tissues of tumor-bearing mice

样品	回归方程	r
血浆	$Y = 167\ 979X + 200.83$	0.999 5
心	$Y = 172\ 497X - 1\ 130.6$	0.999 5
肝	$Y = 190\ 732X + 319.39$	0.999 6
脾	$Y = 187\ 509X - 2\ 073.4$	0.999 5
肺	$Y = 166\ 153X - 241.67$	0.999 5
肾	$Y = 192\ 938X - 744.48$	0.999 8
肿瘤	$Y = 150\ 866X - 4\ 358.0$	0.999 8

2.7.3 精密度试验 配制 2 组低、中、高(0.265,

1.300, 2.650 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 质量浓度的 Ce6 对照品溶液,1 组 1 d 内连续进样 3 次,计算日内精密度;另外 1 组每天测定 1 次,连续测定 3 d,计算日间精密度。结果各样品的日内精密度 RSD 均 < 3.5%, 日间精密度 RSD 均 < 6.8%, 表明仪器精密度良好,符合生物样品的质量控制要求。

2.7.4 回收率试验 按质量浓度为 0.265, 1.300, 2.650 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Ce6 对照品溶液,各取 100 μL 至离心管,分别加入空白血浆样品或各空白组织样品 100 μL ,混匀后得样液;取 Ce6 对照品溶液 100 μL ,加入生理盐水 100 μL ,混匀,同上操作,得母液。将空白血浆及各组织样液与母液分别进行 HPLC 检测,按公式提取回收率 = $C_{\text{样液}}/C_{\text{母液}} \times 100\%$ 计算,结果各质量浓度下血浆及各组织中 Ce6 的回收率均 > 80%, RSD 均 < 5%。

2.8 数据处理 采用 DAS 2.1.1 软件对荷瘤小鼠尾静脉给药后的平均血药浓度-时间数据进行拟合,确定最佳药动学模型,计算分布相半衰期($t_{1/2\alpha}$),消除相半衰期($t_{1/2\beta}$),清除率(CL),药时曲线下面积($\text{AUC}_{0-\infty}$)等相关药动学参数,计算 8 h 内各组荷瘤小鼠血浆、心脏、肝、脾、肺、肾中 AUC_{0-t} ,根据相对摄取率(RE, $\text{RE} = \text{脂质体 } \text{AUC}_{0-t}/\text{溶液 } \text{AUC}_{0-t}$)来判断 Ce6 脂质体对主要器官的靶向性。

2.8.1 药动学参数 荷瘤小鼠给药后血药浓度-时间曲线见图 2,药动学参数见表 2。结果发现尾静脉给药后血浆中 Ce6 在体内的药力学参数符合二室模型,Ce6 脂质体的 $t_{1/2\alpha} = 0.507$ h,其 CL 较低,仅 0.067 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, MRT_{0-t} 是 Ce6 溶液的 2.24 倍; $\text{AUC}_{0-\infty} = 51.475$ $\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$,约为 Ce6 溶液的 3 倍,表明 Ce6 制成脂质体后体内消除速率明显减缓,体内循环时间显著延长,在组织中分布更广。

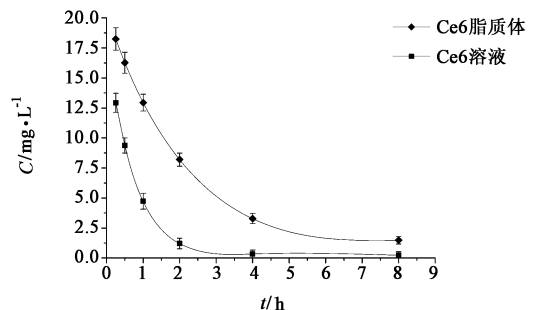


图 2 荷瘤小鼠尾静脉给予不同 Ce6 制剂的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of Ce6 in tumor-bearing mice after administration of various Ce6 preparations ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 尾静脉注射 Ce6 溶液和 Ce6 脂质体后荷瘤小鼠的体内主要药动学参数 ($n=6$)

Table 2 Major pharmacokinetic parameters of Ce6 in tumor-bearing mice after administration of Ce6 solution and liposomes ($n=6$)

参数	Ce6 脂质体	Ce6 溶液
$t_{1/2\alpha}/h$	0.507	1.516
$t_{1/2\beta}/h$	1.366	0.457
$V_d/L \cdot kg^{-1}$	0.147	0.130
$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.067	0.178
$AUC_{0-4}/mg \cdot h \cdot L^{-1}$	46.668	16.444
$AUC_{0-\infty}/mg \cdot h \cdot L^{-1}$	51.475	16.734
MRT_{0-4}/h	1.995	0.892

2.8.2 组织分布 荷瘤小鼠给药后 2 种剂型中 Ce6 在各组织的质量分数随时间的变化情况见表 3。

表 3 荷瘤小鼠尾静脉注射 Ce6 溶液和脂质体后不同时间点各组织中药物质量分数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Concentrations of Ce6 in various tissues of tumor-bearing mice at different time points after administration of Ce6 solution and liposomes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

制剂	组织	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
Ce6 溶液	心	1.727 ± 0.088	2.334 ± 0.137	0.821 ± 0.276	0.610 ± 0.233	0.191 ± 0.051	0.261 ± 0.033
Ce6 脂质体		0.593 ± 0.243	0.762 ± 0.177	0.889 ± 0.128	0.749 ± 0.342	0.452 ± 0.147	0.242 ± 0.079
Ce6 溶液	肝	3.380 ± 0.452	4.084 ± 0.830	2.589 ± 0.285	2.276 ± 0.492	0.582 ± 0.102	0.171 ± 0.046
Ce6 脂质体		4.616 ± 0.680	3.662 ± 0.532	2.412 ± 0.267	1.507 ± 0.372	1.235 ± 0.255	0.439 ± 0.090
Ce6 溶液	脾	1.297 ± 0.066	1.935 ± 0.443	0.722 ± 0.085	1.025 ± 0.128	0.529 ± 0.073	0.307 ± 0.043
Ce6 脂质体		1.709 ± 0.063	1.714 ± 0.154	1.183 ± 0.266	1.170 ± 0.157	0.996 ± 0.143	0.655 ± 0.178
Ce6 溶液	肺	1.776 ± 0.475	1.377 ± 0.247	0.919 ± 0.256	0.883 ± 0.210	0.710 ± 0.157	0.112 ± 0.029
Ce6 脂质体		2.213 ± 0.518	1.449 ± 0.135	1.102 ± 0.215	1.006 ± 0.254	0.581 ± 0.090	0.288 ± 0.071
Ce6 溶液	肾	1.254 ± 0.172	1.241 ± 0.217	0.866 ± 0.171	0.758 ± 0.194	0.201 ± 0.026	0.092 ± 0.021
Ce6 脂质体		1.926 ± 0.134	1.387 ± 0.221	1.210 ± 0.198	1.025 ± 0.184	0.554 ± 0.066	0.411 ± 0.079
Ce6 溶液	肿瘤	2.373 ± 0.451	1.595 ± 0.242	1.538 ± 0.172	2.519 ± 0.417	1.147 ± 0.198	0.727 ± 0.109
Ce6 脂质体		1.078 ± 0.267	1.827 ± 0.313	2.836 ± 0.598	2.381 ± 0.167	1.724 ± 0.428	1.261 ± 0.179

71.1%, 而 Ce6 脂质体则仅降低了 55.5%, 表明 Ce6 脂质体能降低药物在体内的消除速率。

2.8.3 靶向性评价 通过给药后 8 h 内 RE 来评价靶向性, 见表 4。结果发现在肝、脾、肿瘤中, RE 分别为 1.15, 1.48 和 1.28, $RE \leq 1$ 表示无靶向性, >1 表示药物制剂在该器官或组织有靶向性, RE 愈大靶向效果愈好, 说明 Ce6 脂质体能选择性聚集于肝脏和肿瘤组织。

3 讨论

为了研究 Ce6 脂质体的靶向性, 本实验建立了

结果发现 2 种制剂给药后 Ce6 均可快速而广泛地分布到各组织中, 其中在肝脏中分布速度明显最快, 并且 2 种制剂在肝脏中药物质量分数均为最高。同时, Ce6 溶液在心脏中药物浓度却也很高, 而 Ce6 脂质体在心脏中药物质量分数约为 Ce6 溶液的 1/3, 说明脂质体制剂能大大降低心脏中药物浓度。而在肿瘤组织中, Ce6 脂质体与 Ce6 溶液达峰时间分别为 1 h 和 2 h, 前者峰浓度高于后者, 说明脂质体能提高肿瘤部位 Ce6 的浓度。

达峰后, 这 2 种制剂在各组织中的 Ce6 质量分数均开始下降, 至 8 h 时, Ce6 质量分数下降了 55.5% ~ 95.8%, 提示 Ce6 在荷瘤小鼠体内消除速率均较快。但 Ce6 在肿瘤组织中的下降速率明显低于其他组织, 表明 Ce6 本身可能具有肿瘤组织滞留时间长的特点, 且 Ce6 脂质体较 Ce6 溶液在肿瘤组织下降速率更慢, 给药 8 h 后, Ce6 溶液降低了

昆明小鼠 H22 肝癌细胞皮下肿瘤模型, 该模型造模周期短、成功率高、成本廉价、模型重复性好, 这与文献[17]报道一致。尾静脉注射给药, 往往是以生理盐水作为药物的溶剂, 但 Ce6 不溶于生理盐水, 而溶于 pH 7.4 的 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液, 故选择将其作为 Ce6 的溶剂。在给予荷瘤小鼠尾静脉注射 Ce6 溶液和脂质体后, 为了研究药物在各组织中的分布情况, 本文采用 HPLC 测定不同时间点所取样品中 Ce6 浓度。通过预试验确定选择乙腈-0.2% 磷酸水溶液 (50:50) 为流动相, 在此色谱条件下, 样品

表 4 Ce6 脂质体在荷瘤小鼠体内的靶向性评价
Table 4 Targeting evaluation of Ce6 liposomes in tumor-bearing mice

组织	AUC ₀₋₄ /mg·h·L ⁻¹		RE
	Ce6 溶液	Ce6 脂质体	
心	4.297	4.135	0.962
肝	10.350	11.890	1.149
脾	5.596	8.267	1.477
肺	5.601	6.069	1.084
肾	3.541	6.189	1.748
肿瘤	11.320	14.460	1.277

峰与组织内源性物质峰分离度良好。在预试验中, 尝试使用萃取法, 使用三氯甲烷、乙酸乙酯等有机溶剂, 均萃取不出 Ce6, 同时 Ce6 具有光、热不稳定性, 故采用甲醇沉淀蛋白法处理样品, 运用 HPLC 测定生物样品中 Ce6 含量, 其操作简单方便, 同时也避免了萃取法长时间氮吹对药物可能造成影响。

本实验研究表明 Ce6 制成脂质体后体内消除速率明显减缓, 体内循环时间显著延长, 在组织中分布更广。给药后, 2 种制剂中 Ce6 均可快速而广泛地分布到各组织, 其中 Ce6 溶液在心、肝组织中最大药物浓度较其他各组织更高, 而脂质体制剂增加了肝、脾中药物浓度, 同时大大降低了心脏中 Ce6 浓度, 考虑是药物被脂质体包封后, 选择性地单核-巨噬细胞较丰富的肝、脾组织中浓集, 而相应地导致脂质体相较于溶液在心脏中 Ce6 累积量低, 而且该脂质体平均粒径较小, 仅 105.7 nm, 其可通过肝窦状隙到达肝实质细胞而同样使肝组织药物浓度较高。在肿瘤组织中, 无论是 Ce6 溶液还是脂质体制剂, 在肿瘤组织中的下降速率明显低于其他组织, 表明 Ce6 本身具有肿瘤组织聚集性, 这与文献[8]报道一致, 而脂质体制剂在肿瘤组织中 Ce6 浓度达峰时间较溶液剂更快, 峰浓度更高, Ce6 下降速率更慢, 这表明 Ce6 脂质体较 Ce6 溶液更加能选择性聚集于肿瘤组织, 且能延长 Ce6 在肿瘤组织的滞留时间。在肝、脾、肿瘤、肾组织中 RE 分别为 1.149, 1.477, 1.277 和 1.748, 表明 Ce6 脂质体在这些组织有一定的靶向性, 在肾脏中 RE 相对较高, 可能是由于 Ce6 分布在其他组织中后通过原型代谢方式而聚集到肾脏。简而言之, Ce6 脂质体较 Ce6 溶液在体内的生物利用度更高, 在肝、肿瘤组织具有更好的靶向性, 这为 Ce6 脂质体的进一步研究与开发提供了实验依据。

本实验采用传统的血药浓度法及组织匀浆法研

究了药物在荷瘤小鼠的体内过程, 方法虽较简单易行、稳定性好, 但操作繁琐、实验动物用量大、重复性较差。而小动物活体成像系统可以直接对荷瘤小鼠体内的药物进行实时动态观测, 使得实验动物用量大大缩小, 由于数据都是来源于同 1 只小鼠, 故组间差异更小, 结果更直观可靠, 后续研究中可考虑借助小动物活体成像系统来研究制剂中 Ce6 在动物体内的过程。由于声动力疗法强调声敏剂能高度选择性聚集于肿瘤组织等靶部位, 并在靶部位定位聚焦超声以发挥其最大效应, 同时根据声动力疗法的特点, 希望声敏剂能够在聚焦超声时全部释放, 超声前不释放, 故考虑后续对制剂进行改制成控释制剂, 同时为了提高制剂的靶向性, 可考虑制成主动靶向制剂。由于声动力疗法治疗肿瘤时, 其疗效与肿瘤部位的药物浓度密切相关, 而靶向制剂由于定位释药等特点, 其在肿瘤局部的药物浓度与血药浓度的变化不再具有同步性, 故在研究靶向制剂结合声动力疗法治疗肿瘤时, 为了给聚焦超声时超声辐照时间点的选择提供参考, 很有必要对肿瘤局部药物浓度进行动态监测, 而目前仅能借助于微透析采样技术或者小动物活体成像系统进行监测。可以预见, 新型靶向制剂与声动力疗法联合治疗肿瘤时, 药物在靶部位的局部药物动力学研究将会变得很有意义。

[参考文献]

[1] 姚建忠, 沈卫韬, 陈文晖, 等. 二氢卟吩 e6 的合成及其光敏化力和肿瘤光生物活性[J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(5): 215-217.

[2] Kim Y R, Kim S, Choi J W, et al. Bioluminescence-activated deep-tissue photodynamic therapy of cancer [J]. Theranostics, 2015, 5(8): 805-817.

[3] WANG H, WANG X, WANG P, et al. Ultrasound enhances the efficacy of chlorin E6 mediated photodynamic therapy in MDA-MB-231 cells [J]. Ultrasound Med Biol, 2013, 39(9): 1713-1724.

[4] 黄苏苏, 谢波, 凌家俊, 等. 二氢卟吩 e6 磁性声敏纳米脂质体的制备及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 21-26.

[5] Hirohara S, Oka C, Totani M, et al. Synthesis, photophysical properties, and biological evaluation of trans-bisthioglycosylated tetrakis (fluorophenyl) chlorin for photodynamic therapy [J]. J Med Chem, 2015, 58(21): 8658-8670.

[6] Shton I O, Sarnatskaya V V, Prokopenko I V, et al. Chlorin e6 combined with albumin nanoparticles as a

- potential composite photosensitizer for photodynamic therapy of tumors [J]. *Exp Oncol*, 2015, 37 (4): 250-254.
- [7] 孙玉琦,沈丽萍,颜冬雪,等. 肝脏疾病治疗药物靶向脂质体研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(2): 193-196.
- [8] 秦晓飞,史海涛,崔兴业,等. 二氢卟吩 e6 在艾氏荷瘤小鼠体内的分布[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(2): 91-94.
- [9] ZHU H M, GU J H, XIE Y, et al. Hydroxycamptothecin liposomes based on thermal and magnetic dual-responsive system: preparation, *in vitro* and *in vivo* antitumor activity, microdialysis-based tumor pharmacokinetics [J]. *J Drug Target*, 2018, 26 (4): 345-356.
- [10] 凌家俊,古锦辉,谢毅,等. 羟基喜树碱磁性脂质体的制备及其靶向性特征试验[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 19-23.
- [11] 周莉玲,王岩,刘清飞,等. 青藤碱脂质体包封率的测定[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(9): 731-734.
- [12] 王安元,凌家俊,徐月圆,等. 二氢卟吩 e6 脂质体的制备及影响因素考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 36-39.
- [13] 庚丽丽,隋琳,张朋美,等. 大黄酚 pH 敏感性脂质体的制备及其质量评价[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(10): 1189-1193.
- [14] 陈丽霞,任连生,杨永明,等. 瑞香狼毒水提醇沉物对 H22 荷瘤小鼠抑瘤作用研究[J]. 中国药物与临床, 2017, 17(4): 489-491.
- [15] 汤晗霄,赵天文,黄宇,等. 鳖甲肽脂质体药代动力学及肝靶向分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9): 68-73.
- [16] 冯爽,包海鹰,池梦怡,等. 阿里红活性成分 3-酮基-去氢硫色多孔菌酸在大鼠体内的药物代谢动力学及组织分布[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 84-87.
- [17] TANG X, HUANG J, XIONG H, et al. Anti-tumor effects of the polysaccharide isolated from *tarphochlamys affinis* in H22 tumor-bearing mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(3): 1040-1050.

[责任编辑 刘德文]