

丝裂霉素纤维蛋白胶凝胶化疗的缓释特性

殷香保, 王捷, 伍衡, 陈汝福, 汤志华, 廖洪映

(中山大学附属第二医院普外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨丝裂霉素纤维蛋白胶凝胶(MMC/FG)化疗的缓释特性。【方法】体外释放实验中,将 8 mg 丝裂霉素(MMC)与 5 mL 纤维蛋白胶(FG)混合成凝胶 MMC/FG,将凝胶置于 50 mL 含纤溶酶原及尿激酶的磷酸盐缓冲液(PBS)中,在 37 °C 恒温摇床中培养。分别于开始培养 15 min、2、8、24、48、72、96、120 h 后取 0.1 mL PBS 作样本,测试其中的 MMC 质量浓度,观察 MMC 的释放过程。体内实验中,将 MMC/FG(实验组)或单纯 MMC 溶液(对照组)在开腹直视下注入小鼠肝脏,定时取小鼠肝脏及少量外周血作样本,测试样本中的 MMC 质量浓度,计算肝脏及外周血中 MMC 的动力学参数。【结果】体外释放实验显示 2 h 后 MMC 的累计释放率为(33.91 ± 2.29)% 24 h 后为(64.46 ± 3.18)% 96 h 后释放趋于平衡。动物实验显示,肝组织 MMC 峰质量浓度(ρ_{\max})两组差别无统计学意义($P > 0.05$),外周血 ρ_{\max} 实验组显著低于对照组($P < 0.01$);肝组织及外周血 MMC 的消除半衰期($t_{1/2}$)及曲线下面积(AUC)实验组均明显长于或大于对照组($P < 0.01$)。【结论】在体内外条件下 MMC/FG 均有良好的缓释性,在小鼠肝脏局部使用 MMC/FG,可延长 MMC 在肝脏的滞留时间,降低其在外周血的质量浓度。

关键词:纤维蛋白组织粘着剂;丝裂霉素 C;迟效制剂;药代动力学

中图分类号:R656.3

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2004)06-0542-04

Sustained Release Property of Chemotherapy by Fibrin Glue Enwrapping Mitomycin

YIN Xiang-bao, WANG Jie, WU Heng, CHEN Ru-fu, TANG Zhi-hua, LIAO Hong-ying

(Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the sustained release property of chemotherapy by fibrin glue enwrapping mitomycin (MMC/FG). 【Methods】*In vitro* release study, MMC/FG was obtained by mixing 8 mg of mitomycin(MMC) with 5 mL of fibrin glue(FG). Then the glue was put into 50 mL of phosphate buffered saline (PBS) containing plasminogen and urokinase, which was incubated in a cradle at 37 °C. Respectively, 0.1 mL of PBS was taken as sample 15 min, 2, 8, 24, 48, 72, 96, and 120 h after incubation. Concentration of MMC of each sample was determined to show the release process of MMC. *In vivo* study, MMC/FG (study group) or solution of simple MMC (control group) was injected into the livers of mice by celiotomy. At fixed times the livers and some peripheral blood of the mice were collected respectively as samples whose concentrations of MMC were determined. Then the pharmacokinetic parameters of MMC in livers and peripheral blood were calculated. 【Results】*In vitro* release study revealed that the accumulative release rate of MMC was (33.91 ± 2.29)% 2 h after incubation and it rose to (64.46 ± 3.18)% 24 h later. The release process went to a balance condition 96 h later. *In vivo* study indicated that there was no significant difference in the peak concentration (ρ_{\max}) of MMC in livers between groups ($P > 0.05$) while ρ_{\max} in peripheral blood of study group was significantly lower than that of control group ($P < 0.01$). The elimination

收稿日期:2004-06-09

基金项目:广东省科委重点攻关科学基金资助项目(99042)

作者简介:殷香保(1974-),男,江西南昌人,硕士,住院医师;王捷,教授,导师,通讯作者。E-mail: yxb115@sina.com

half-life ($t_{1/2}$) and the area under curve (AUC) in both livers and peripheral blood of study group were significantly longer or larger than those of control group ($P < 0.01$). **Conclusions** MMC/FG takes on a perfect sustained release property both *in vitro* and *in vivo*. Using MMC/FG in livers of mice locally can prolong the staying period of MMC in livers and reduce its concentration in peripheral blood.

Key words: fibrin tissue adhesive; mitomycin; delayed-action preparations; pharmacokinetics

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25 (6): 542 - 545]

丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 对肿瘤细胞具有很强的杀伤作用, 但它在体内的代谢非常迅速, 如能延长 MMC 在肿瘤区域的滞留时间, 降低其在外周血中的浓度, 必将显著提高其化疗效果, 减轻化疗毒副作用。近年, 国外有研究者利用纤维蛋白胶 (fibrin glue, FG) 能包裹药物及在体内分解缓慢等特点, 将其作为某些抗肿瘤药、抗生素等药物的缓释载体, 取得了较好的效果^[1-4]。为考察这一方法的可靠性, 笔者通过观察体外条件下 MMC/FG 凝胶的缓释特性以及其在小鼠体内的药代动力学过程, 以探讨 MMC/FG 凝胶在术中行局部缓释化疗的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂 MMC (日本协和发酵工业株式会社), FG (广州倍绣生物技术有限公司, 商品名为医用生物蛋白胶), 尿激酶 (广州天普生化医药股份有限公司), 纤溶酶原 (美国 Sigma 公司)。

1.1.2 仪器 HP 1100 型高效液相色谱仪、DAD 检测器及化学工作站 (美国 Hewlett Packard 公司), G1328A 型手动进样器, Merck Lichrospher 100 RP-18 型色谱柱, HWY-211 型恒温培养摇床 (上海智城分析仪器制造公司), TL-5.0 型台式离心机 (上海市离心机械研究所, 离心半径 17.5 cm), XW-80A 型旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂)。

1.1.3 实验动物 一级昆明小鼠, 由中山大学医学实验动物部提供。

1.2 体外释放实验

1.2.1 释放条件 将 8 mg MMC 溶于 2.5 mL FG 催化液中, 与 2.5 mL FG 主体液用混合注射器混合成凝胶 (MMC/FG), 置于 50 mL pH 为 7.4 的标准磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中, PBS 中预先加入 5 mg 纤溶酶原及 100×10^3 IU 尿激酶^[2]。将 PBS 放置在 37 °C 恒温培养摇床中, 以

120 r/min 的速度持续摇荡。分别在开始培养后 15 min、2、8、24、48、72、96、120 h 取 0.1 mL PBS 作样本, 每次取样本后补充同体积的 PBS。共进行 5 次平行实验。

1.2.2 样本测试 采用高效液相色谱法 (high pressure liquid chromatography, HPLC) 测试样本中 MMC 的质量浓度。色谱条件: 色谱柱为 Merck Lichrospher 100 RP-18 (250 mm × 4 mm, 5 μm), 流动相: CH₃OH/H₂O = 60/40 (V/V), 流速: 0.8 mL/min, 检测波长: 365 nm, 加样体积: 20 μL, 室温控制在 25 °C。

1.2.3 累积释放率的计算 根据公式:

$$\frac{C_i + V + \sum (C_i - I \times v)}{m_{\text{MMC}}} \times 100\%$$

计算各时点的累积释放率。式中 C_i 为各时间质量浓度 (mg/L), V 为 PBS 总体积 (L), v 为样本体积 (L), m_{MMC} 为 MMC 总质量 (mg)。根据计算结果作 MMC 累积释放率-时间曲线。

1.3 动物实验

1.3.1 给药方法 昆明小鼠 120 只, 个体质量 (20 ± 2) g, 雌雄不限, 随机分成 2 组, 每组 60 只。每只小鼠均在腹腔麻醉下开腹, 在直视下按 MMC 0.5 mg/kg 剂量向肝脏中叶注射 MMC/FG (实验组) 或单纯 MMC 溶液 (对照组), 关腹饲养。

1.3.2 样本采集 分别于注药后 5、15、30 min、1、2、4、6、8、24、48、72、96 h 各取 5 只小鼠, 眶静脉采集血液约 2 mL 作样本, 然后处死小鼠, 取出完整肝脏作样本。

1.3.3 样本测试 血液样本取出后即以 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清血浆于 4 °C 冰箱中保存; 肝组织则研磨成匀浆后于 4 °C 冰箱中保存。测试前向样本中加入 5 mL 氯仿与异丙醇 (1:1) 混合液, 旋涡混合器充分混匀, 2 000 r/min 离心 15 min, 取上清有机液层, 氮气吹干, PBS 冲洗定容至 0.2 mL, 1 500 r/min 离心 5 min, 取上清液 20 μL 注入进样器测试, 色谱条件同体外实验。

1.3.4 数据处理 动力学参数计算按以下方法：峰质量浓度 (ρ_{\max})取实测值,消除半衰期 ($t_{1/2}$)= $0.693/\lambda_2$, λ_2 为对数药物质量浓度-时间曲线末端直线部分的斜率,曲线下面积 (area under curve, AUC) 采用梯形法计算。组间参数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 体外释放实验

在体外条件下 MMC 的释放非常缓慢并成一定的线性,早期释放相对较快,2 h 时 MMC 的累积释放率为 $(33.91 \pm 2.29)\%$, 24 h 时为 $(64.46 \pm 3.18)\%$,以后释放逐渐减慢,96 h 时累积释放率达 $(88.33 \pm 5.34)\%$,此后释放趋于平衡(图 1)。

2.2 动物实验

肝组织 MMC 峰质量浓度两组相差不大,实验组药物在肝脏的滞留时间较长,96 h 仍可测出药

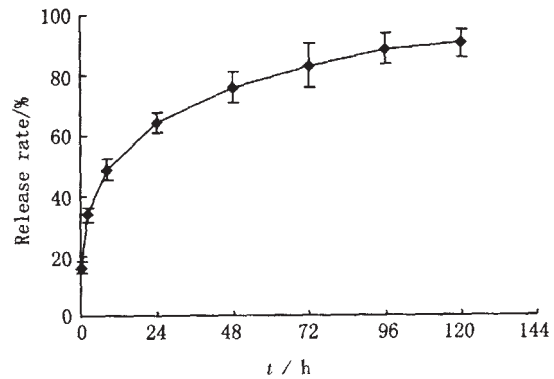


图 1 体外实验 MMC 累积释放率

Fig. 1 Accumulative release rate of MMC in vitro ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

物;对照组药物在肝脏的滞留时间较短,6 h 以后肝组织即测不出 MMC。外周血 MMC 持续时间实验组明显比对照组长,分别为 48 h 及 6 h,而药物峰质量浓度实验组明显低于对照组(表 1)。

表 1 肝组织及外周血 MMC 质量浓度

Table 1 Mass concentration of MMC in livers and peripheral blood ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

t/h	$\rho_{(mmc, liver)} / (mg \cdot kg^{-1})$		$\rho_{(mmc, pb)} / (mg \cdot L^{-1})$	
	Study group	Control group	Study group	Control group
0.08	9.82 ± 1.52	8.47 ± 1.12	0.11 ± 0.02	0.85 ± 0.13
0.25	9.23 ± 1.35	6.93 ± 0.85	0.25 ± 0.04	1.65 ± 0.24
0.50	8.73 ± 1.48	4.85 ± 0.35	0.31 ± 0.06	1.37 ± 0.12
1.00	8.30 ± 1.21	2.79 ± 0.44	0.39 ± 0.05	1.18 ± 0.10
2.00	7.86 ± 1.06	0.81 ± 0.12	0.46 ± 0.07	0.63 ± 0.12
4.00	6.71 ± 0.72	0.29 ± 0.05	0.43 ± 0.08	0.19 ± 0.05
6.00	5.93 ± 0.84	0.08 ± 0.03	0.40 ± 0.06	0.05 ± 0.02
8.00	5.41 ± 0.49		0.38 ± 0.05	
24.00	2.38 ± 0.32		0.18 ± 0.04	
48.00	0.75 ± 0.12		0.06 ± 0.02	
72.00	0.26 ± 0.05			
96.00	0.07 ± 0.02			

1) $\rho_{(mmc, liver)}$: mass concentration of MMC in livers; 2) $\rho_{(mmc, pb)}$: mass concentration of MMC in peripheral blood

表 2 肝组织及外周血中 MMC 的动力学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters of MMC in livers and peripheral blood ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Group	Livers			Peripheral blood			Ratio of AUC ⁵⁾
	$\rho_{l, max}^{1)}/(mg \cdot kg^{-1})$	AUC ^{2)/} ($mg \cdot h \cdot kg^{-1}$)	$t_{1/2}^{3)}/h$	$\rho_{b, max}^{4)}/(mg \cdot L^{-1})$	AUC/($mg \cdot h \cdot L^{-1}$)	$t_{1/2}/h$	
Control	8.47 ± 1.00	8.34 ± 0.48	0.88 ± 0.04	1.65 ± 0.22	3.29 ± 0.18	1.26 ± 0.10	2.54 ± 0.22
Study	9.82 ± 1.32	220.2 ± 37.6	13.95 ± 0.71	0.46 ± 0.06	14.89 ± 1.81	15.43 ± 2.50	14.82 ± 1.96
t	1.82	12.61	41.12	11.86	14.25	12.67	13.95
p	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

1) $\rho_{l, max}$: peak mass concentration of MMC in livers; 2) AUC: area under curve; 3) $t_{1/2}$: elimination half-life; 4) $\rho_{b, max}$: peak concentration of MMC in peripheral blood; 5) Ratio of AUC: the ratio of AUC of liver to that of peripheral blood

动力学参数结果显示,实验组肝组织及外周血 AUC 及 $t_{1/2}$ 均显著大于对照组 ($P < 0.01$),表明 MMC/FG 具有良好的缓释特性。实验组 AUC 比值(肝组织 AUC 与外周血 AUC 之比)明显大于对照组 ($P < 0.01$),表明实验组 MMC 在肝脏的分布比例明显大于对照组(表 2)。

3 讨 论

本研究结果表明,在体外及体内条件下,MMC/FG 凝胶均具有良好的缓释特性。体外释放实验结果显示,MMC/FG 凝胶在 PBS 中释放 MMC 可持续 96 h。动物实验结果显示,MMC/FG 凝胶能显著延长 MMC 在肝脏的滞留时间,降低外周血中 MMC 的峰质量浓度。虽然 MMC/FG 也使外周血中 MMC 的滞留时间明显延长,但其药物浓度保持在较低水平,而通常化疗毒副反应主要是由于全身血药浓度水平过高引起。因此,从理论上分析,术中应用 MMC/FG 凝胶辅助治疗肝脏肿瘤,可望提高化疗效果,减轻全身毒副反应。

FG 对同 MMC 的缓释作用与 FG 的特性密切相关。FG 在体内具有相对稳定性,一般在 1 周内逐渐被机体降解吸收。当 MMC 与 FG 混合后,MMC 被包裹在 FG 凝胶内,随着 FG 在体内降解,MMC 才逐渐释放,这样,FG 就起到暂时贮存和缓释药物的作用,能提高局部药物浓度,延长药物在局部的滞留时间,减少进入血液循环的药量。FG 的上述特性已得到有关研究的证实,如 Kitazawa 等^[5]将阿霉素与 FG 混合喷涂于肿瘤上,发现肿瘤细胞外液药物 AUC 比血浆高 800 多倍。

在动物实验中,MMC/FG 的给药途径采用了开腹直视下肝脏内注射,主要是为了保证凝胶确实注入肝脏并且在肝脏的同一部位,避免因注射不到位或注射部位不同所引起的偏差;同时,也可造成开腹手术的机体应激状态,这正与临床上 MMC/FG 的化疗途径相适应,因为笔者设想的 MMC/FG 局部缓释化疗正是在开腹手术的过程中给药的。

本实验所使用的 FG(医用生物蛋白胶)由 A、B 两种试剂组成。试剂 A 包括生物胶主体及主体溶解液两部分,主要含高浓度的纤维蛋白原及凝血因子 XIII;试剂 B 则包括催化剂及催化剂溶解液,主要含凝血酶原和氯化钙。FG 的作用原理是,利用上述参与凝血的有关成分,模拟机体凝血过程的最后

阶段,形成纤维蛋白凝胶。一般 A、B 试剂混合后 5~10 s 即可成胶,3~5 min 明显强化,产生理想的止血、封闭、粘合及缓释作用。

FG 作为抗肿瘤药物的缓释剂,具有以下潜在优点:① FG 在体内具有良好组织相容性,可完全被机体吸收,无毒副作用,不会引起机体的免疫排斥及过敏反应。② FG 是一种生物蛋白制剂,在机体主要经淋巴途径吸收,化疗药物可能随着 FG 的吸收进入淋巴系统,起到“淋巴化疗”作用,这对于以淋巴转移为主的胃癌、乳腺癌可能更有价值^[6]。③ 肿瘤切除后用 FG 覆盖创面,利用凝胶的黏附性可能网住残余肿瘤细胞,防止其向远处播散^[7]。④ 操作非常方便,只需在手术结束前将 FG 与抗肿瘤药混合喷涂在手术创面上即可,同时还可起到促进创面止血及伤口愈合的作用。因此,抗肿瘤药 FG 凝胶化疗可望成为临床医生治疗恶性肿瘤的新手段,但其确切疗效还有待大宗临床病例的考证。

参考文献:

- [1] 殷香保,王捷. 纤维蛋白胶的临床应用进展[J]. 岭南现代临床外科, 2003, 1(1): 67-9.
- [2] Yoshida H, Yamaoka Y, Shinoyama M, *et al.* Novel drug delivery system using autologous fibrin glue-release properties of anti-cancer drugs[J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(3): 371-4.
- [3] Woolverton C J, Fulton J A, Salstrom S J, *et al.* Tetracycline delivery from fibrin controls peritoneal infection without measurable systemic antibiotic[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(6): 861-7.
- [4] Kitajiri S, Tabuchi K, Hiraumi H, *et al.* Relief of post-tonsillectomy pain by release of lidocaine from fibrin glue[J]. *Laryngoscope*, 2001, 111(4): 642-4.
- [5] Kitazawa H, Sato H, Adadfi I, *et al.* Microdialysis assessment of fibrin glue containing sodium alginate for local delivery of doxorubicin in tumor-bearing rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(3): 278-81.
- [6] Langer S, Guenther J M, DiFronzo L A. Does fibrin sealant reduce drain output and allow earlier removal of drainage catheters in women undergoing operation for breast cancer[J]. *Am Surg*, 2003, 69(1): 77-81.
- [7] Takagi T, Ito T, Shimomura K, *et al.* Intraoperative coating of tumor surface using fibrin glue as a prophylaxis for cancer cell detachment[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2001, 28(11): 1674-6.

(编辑 张敏瑞)