

· 基础研究 ·

高压氧对顺铂在脑胶质瘤大鼠体内药代动力学的影响

李咪咪 黄品芳 许昌声 刘芳

【摘要】 目的 观察高压氧(HBO)对顺铂在脑胶质瘤大鼠体内药代动力学的影响。**方法** 建立 SD 大鼠 C6 细胞脑胶质瘤模型,14 d 后,选取 84 只造模成功大鼠,按照随机数字表法分为对照组和 HBO 组,每组 42 只。2 组大鼠均经尾静脉注射顺铂 1 mg/kg,每日 1 次,连续 7 d;HBO 组于每次顺铂注射后进行 HBO 治疗,对照组常压常氧下活动。第 7 天于顺铂注射后不同时间点(5 min、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h)每时间点取 6 只大鼠,采集血液、脑脊液及脑瘤组织;高效液相色谱法测定顺铂浓度,应用 3P97 药物代谢动力学程序拟合药物代谢动力学参数,并进行统计学比较分析。**结果** 2 组大鼠血液顺铂峰浓度(C_{max})、消除半衰期($T_{1/2}$)、药物浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-8h})比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,HBO 组大鼠脑脊液顺铂浓度于 5 min~2 h 之间显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组 C_{max} 、 $T_{1/2}$ 、 AUC_{0-8h} 分别为 $(9.52\pm1.65)\mu\text{g/ml}$ 、 $(0.81\pm0.13)\text{h}$ 、 $(9.31\pm0.71)\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$,HBO 组 C_{max} 、 $T_{1/2}$ 、 AUC_{0-8h} 分别为 $(2.38\pm0.15)\mu\text{g/ml}$ 、 $(2.18\pm0.17)\text{h}$ 、 $(4.12\pm0.42)\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$,明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,HBO 组大鼠瘤组织顺铂浓度于 5 min~8 h 之间显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$); C_{max} 、 $T_{1/2}$ 、 AUC_{0-8h} 分别为 $(2.14\pm0.16)\mu\text{g/ml}$ 、 $(3.16\pm0.65)\text{h}$ 、 $(6.28\pm0.98)\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$,明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** HBO 可增加顺铂在 C6 脑胶质瘤模型大鼠脑组织中的分布,并延长其在脑瘤组织的消除半衰期。

【关键词】 高压氧; 顺铂; 血脑屏障; 脑胶质瘤

基金项目:福建省自然科学基金资助课题(X0750030)

The effect of hyperbaric oxygen on the pharmacokinetics of cisplatin in rats modelling brain glioma Li Mi-mi*, Huang Pinfang, Xu Changsheng, Liu Fang. * The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

Corresponding author: Huang Pinfang, Email: hpf66@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on the pharmacokinetics of cisplatin in rats modelling brain glioma. **Methods** A model of brain glioma was introduced successfully into each of 84 adult male Sprague-Dawley rats through injecting C6 cells. Fourteen days later they were randomly divided into a control group and an HBO group, each of 42. Both groups were given intravenous cisplatin injections (1 mg/kg) daily for 7 days. The HBO group was additionally given HBO therapy every day after the injection of cisplatin. On the 7th day, the blood, cerebrospinal fluid and tumor tissues of 6 rats from each group were collected 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 8 h after the last injection. The concentrations of cisplatin were measured using high performance liquid chromatography, and the data were analyzed using the 3P97 program of pharmacokinetics. **Results** There was no significant difference between the two groups in the peak cisplatin concentration (C_{max}), terminal half life time ($T_{1/2}$) and the area under the drug concentration-time curve (AUC_{0-8h}). Compared with the control group, the average cisplatin concentration in the cerebrospinal fluid of the HBO group increased significantly more from 5 min to 2 h after the last injection. Compared with the control group, the average cisplatin concentration in the tumorous tissues of the HBO group increased significantly more from 5 min to 8 h after the last injection. **Conclusions** HBO can promote the distribution of cisplatin in the brain in response to glioma and prolong its half-life in tumorous brain tissue.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Glioma; Blood brain barrier; Cisplatin

Fund program: Fujian Province Natural Science Foundation (grant X0750030)

顺铂(cisplatin)是临床常用的细胞周期非特异性抗肿瘤药物,对脑癌、鼻咽癌、肺癌等均有良好疗效,以顺铂为主的联合化疗是恶性神经系统肿瘤的主要治疗方案^[1]。血脑屏障(blood-brain barrier)是限制顺铂等水溶性抗肿瘤药物进入脑组织的主要因素,可影响脑肿瘤化疗效果。本课题组前期研究表明,高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)可以安全有效地开放血脑屏障,提高药物脑组织浓度^[2]。本研究通过观察 HBO 对顺铂在脑胶质瘤大鼠血液、脑脊液及脑瘤组织中药物代谢动力学的影响,探讨 HBO 在颅内肿瘤综合治疗中的可行性。

材料与方法

一、实验动物及试剂、仪器

选取清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 84 只,体重(250±10)g,由福建医科大学实验动物中心提供。注射用顺铂(10 mg/瓶),购于齐鲁制药有限公司,生产批号 1503006A; Waters 高效液相色谱系统购于美国;YC2680/0.3-16 型空气加压舱产自烟台;C6 细胞株购于中科院上海细胞库,胎牛血清、胰蛋白酶、1640 培养基购于 GIBCO 公司;Thermo Scientific CRS 自动化细胞培养系统,超净工作台购于江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司,江湾 I 型大鼠脑立体定向仪购于第二军医大学。

二、C6 大鼠脑胶质瘤模型动物的建立

1. 细胞培养:将 C6 细胞分装于 75 cm²(底面积)的培养瓶中。加入 8~10 ml 体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。在细胞处于指数生长期时,以胰蛋白酶适量消化 3~5 min 后,弃去消化液。用 Hanks 液吹打冲洗 1~2 次形成细胞悬液,调细胞浓度为 1.5×10⁸ 个/ml C6 细胞的悬液用于接种。

2. 颅内接种:将麻醉后的大鼠头部固定在脑立体定向仪上,剪去头顶部毛发,碘伏消毒后铺洞巾。取内眦连线与头部正中矢状面交点,向后纵向切开头皮约 1 cm,分离暴露颅骨。根据 Batker 法确定右尾状核靶点,于冠状缝前 1 mm、中线右旁开 3 mm,以牙科钻在颅骨上钻孔,孔径约 1.2 mm,深达硬脑膜表面而不伤及脑组织。25 μl 微量注射器抽取 C6 细胞悬液 10 μl,沿骨孔缓慢匀速注射,注射完毕后留针 5 min,缓慢退针,骨孔用医用明胶海绵填充,骨蜡封闭。生理盐水冲洗手术区,无菌丝线缝合切口后消毒皮肤,术后加用青霉素抗感染,整个过程在层流超净台中进行,麻醉复苏后单笼常规饲养^[3]。接种后 14 d,随机抽取 5 只大鼠,取脑组织观察病理学变化,显微镜下可见梭形细胞密集排列,呈浸润性生长,细胞异型性明显,细胞核分裂

相易见,肿瘤中心有明显的出血及栅栏状坏死,肿瘤微血管丰富,证明造模成功。

三、分组及干预方法

正常喂养 14 d 后,取 84 只造模成功的大鼠,采用随机数字表法分为对照组及 HBO 组,每组 42 只。所有大鼠均经尾静脉注射顺铂 1 mg/kg,每日 1 次,连续 7 d。对照组大鼠在常压常氧下活动,HBO 组每次药物注射后立即进行 HBO 治疗。

HBO 治疗方案:将 HBO 组大鼠置于自制的木箱内,木箱内径为 40 cm×45 cm×20 cm,两侧分别开有 1 个直径为 2 cm 的圆孔,靠近箱底部的孔为进气孔,与输氧管相连,靠近箱顶部的孔为出气孔,与排气管相连,为便于观察,箱顶采用玻璃推盖。实验采用烟台 YC2680/0.3-16 型空气加压舱,将 HBO 组大鼠置于治疗舱内,经舱内一级供氧装置持续供给纯氧,约 10 min 后箱内氧浓度 ≥ 95%,持续供给纯氧至治疗结束。10 min 匀速将舱压加压至 0.25 MPa,稳压 60 min,25 min 匀速减压出舱。

四、血液、脑脊液、脑瘤组织标本采集、样品处理及含量测定

第 7 天,于顺铂注射后相应的时间点(5 min、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h)每组各取 6 只大鼠,依次采血、脑脊液、脑瘤组织标本并进行血液、脑脊液、脑瘤组织顺铂浓度含量测定。

1. 血液标本:大鼠经尾静脉采血 2 ml,3000 rpm 离心 10 min,取上清液 1 ml。保存于-20 ℃的冰箱中,待测。取 200 μl 上清液加入 400 μl 甲醇,沉淀蛋白,1000 r/min 离心 10 min,取上清液于 1.5 ml 离心管中,然后加入氯化镍 10 μl(2 μg/ml)、5% 二乙基二硫代氨基甲酸钠 10 μl,混匀,37 ℃水浴温孵 30 min,冷却至室温,加入氯仿 400 μl,涡旋混匀 2 min,加入 5% 二乙基二硫代氨基甲酸钠 10 μl,混匀,37 ℃水浴温孵 30 min,冷却至室温,加入氯仿 800 μl 萃取,1000 rpm 离心 10 min,吸取氯仿层于新的 1.5 ml 离心管中,氮气吹干,流动相复溶,60 μl 进样检测分析。以上方法参考文献[4]并略有改进。色谱条件为:采用 Waters 高效液相色谱系统,色谱柱为 Hypersil ODS(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇:水=70:30,流速为 1.0 ml/min,检测波长为 254 nm,柱温为 30 ℃。

2. 脑脊液标本:大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛(5 ml/kg)麻醉,通过触摸找到枕骨嵴,以其下方 3 mm 处的肌肉间隙为进针点,用手触摸有三角形凹陷,进针角度与大鼠身体平行,即针与头部的角度为 135°,针尖坡面向上,缓慢前进 0.5 cm 处即为小脑延髓池。进针过程中,当感觉到抵触感时,表明针尖已触及到黄韧带,针尖刺透黄韧带后会出现漏空感,此时针尖部位到

达小脑延髓池,发现有透明无色液体进入针管后,立即停止进针,缓慢抽取 80~100 μl 脑脊液后,迅速退针^[5]。保存于-20℃的冰箱中,待测。后续过程同血液标本处理。

3. 脑瘤组织标本:大鼠处死,开颅取肿瘤组织和肿瘤周围组织,脑组织样品冰浴,制备匀浆液(脑组织:生理盐水=1:4),3000 rpm 离心 5 min,取上清液,保存于-20℃的冰箱中,待测。后续过程同血液标本处理。

五、数据处理及统计学分析

药物浓度测定结果应用中国药理学学会数理分会编制的 3P97 药物代谢动力学软件进行处理,计算药物代谢动力学参数。所有数据均采用($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 版统计学软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、HBO 对大鼠血液顺铂药物浓度-时间曲线影响

顺铂经尾静脉连续注射 7 d,于 7 d 注射结束不同时间点取大鼠血液,采用高效液相色谱系统测定浓度。结果显示,HBO 组、对照组血液顺铂浓度均呈时间依赖性降低。详见图 1。

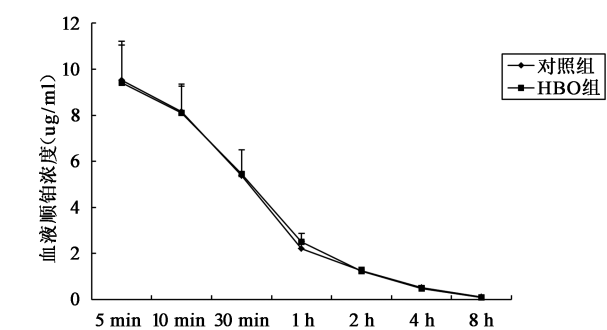


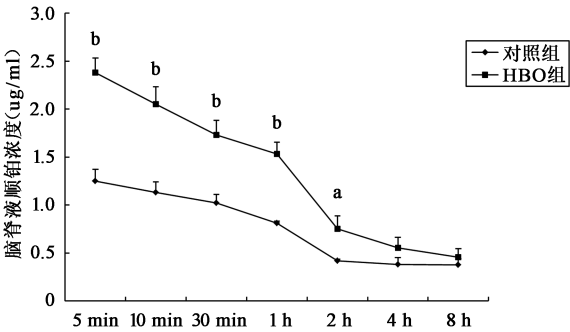
图 1 HBO 对大鼠血液顺铂药物浓度-时间曲线的影响($n=6$)

二、HBO 对大鼠脑脊液顺铂药物浓度-时间曲线的影响

顺铂经尾静脉连续注射 7 d,于 7 d 注射结束不同时间点取大鼠脑脊液,采用高效液相色谱系统测定浓度。与对照组比较,HBO 组大鼠脑脊液顺铂浓度于 5 min 至 2 h 之间显著增加($P<0.05$),差异有统计学意义($P<0.01$)。详见图 2。

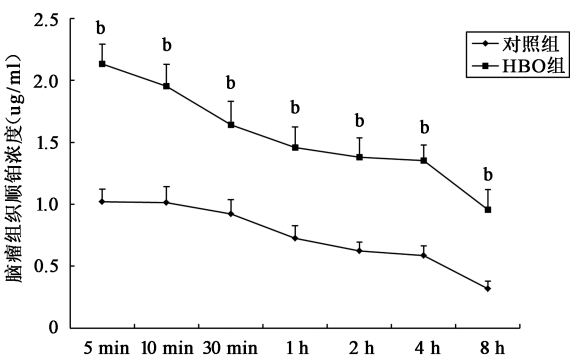
三、HBO 对大鼠脑瘤组织顺铂药物浓度-时间曲线的影响

顺铂经尾静脉连续注射 7 d,于 7 d 注射结束不同时间点取大鼠脑瘤组织,采用高效液相色谱系统测定浓度。结果显示,HBO 组大鼠瘤组织顺铂浓度于 5 min 至 8 h 之间均高于对照组($P<0.01$)。详见图 3。



注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

图 2 HBO 对大鼠脑脊液顺铂药物浓度-时间曲线的影响($n=6$)



注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

图 3 HBO 对大鼠脑瘤组织顺铂药物浓度-时间曲线的影响

四、HBO 对大鼠血液、脑脊液、脑瘤组织顺铂药物代谢动力学参数的影响

2 组间血液顺铂峰浓度(C_{max})、消除半衰期($T_{1/2}$)、0 至 8 h 药物浓度-时间曲线下面积(area under the curve,AUC)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,HBO 组脑脊液、脑瘤组织 C_{max} 、 $T_{1/2}$ 和 AUC_{0-8h} 均显著增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。详见表 1。

表 1 HBO 对大鼠血液、脑脊液、脑瘤组织顺铂药物代谢动力学参数的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	$C_{max}(\mu g/ml)$		
		血液	脑脊液	脑瘤组织
对照组	42	9.52 ± 1.65	1.25 ± 0.12	1.02 ± 0.10
HBO 组	42	9.41 ± 1.52	2.38 ± 0.15^a	2.14 ± 0.16^a
组别	例数	$T_{1/2}(h)$		
		血液	脑脊液	脑瘤组织
对照组	42	0.81 ± 0.13	1.45 ± 0.41	2.48 ± 0.47
HBO 组	42	0.85 ± 0.12	2.18 ± 0.17^a	3.16 ± 0.65^a
组别	例数	$AUC_{0-8h}(mg\cdot min\cdot L^{-1})$		
		血液	脑脊液	脑瘤组织
对照组	42	9.31 ± 0.71	2.57 ± 0.25	3.73 ± 0.41
HBO 组	42	9.26 ± 0.78	4.12 ± 0.42^b	6.28 ± 0.98^a

注:与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$

讨 论

脑胶质瘤大多数呈膨胀性和浸润性生长,手术不

易切除,预后相对较差,药物治疗与手术、放射治疗共同构成了胶质瘤综合治疗体系。临床中胶质瘤的化疗效果往往难以令人满意,主要是由于血脑屏障影响了药物进入脑组织,使肿瘤部位不能达到有效药物浓度。水溶性化疗药物顺铂不易透过血脑屏障,如采取大剂量化疗,其全身毒性作用较大,患者难以耐受。因此,安全有效的开放血脑屏障、提高顺铂脑组织浓度对脑胶质瘤的治疗具有重要意义。近年来研究发现,局部用药如颈动脉、鞘内及肿瘤内用药,可提高脑内顺铂浓度,减少毒性,提高疗效^[6];但其操作复杂、创伤较大,且对中枢神经系统有潜在的危害,未得到广泛应用。

本课题前期研究发现,HBO 治疗后大鼠脑脊液药物浓度增高^[7]。林静等^[8]也证实 HBO 可以增加甲氨蝶呤血脑屏障通过率。本研究发现,HBO 组大鼠顺铂脑脊液浓度于 5 min 至 2 h 之间较对照组显著增加($P<0.05$),药代动力学参数 C_{max} 、 $T_{1/2}$ 和 AUC_{0-8h} 均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 HBO 能够有效增加脑脊液顺铂浓度。HBO 作为一种无创性治疗方法,可以改善组织血氧分压,促进血管新生,改善局部微循环,抑制炎症因子释放^[9]。Cevik 等^[10]将大鼠分别暴露于高压和 HBO 下,结果发现,两种状态下的大鼠血脑屏障均有一定程度的开放,与高压组大鼠比较,HBO 组大鼠水通道蛋白-4(aquaporin-4, AQP-4)表达水平上调,AQP-4 主要分布于血脑屏障两侧,在介导水分子透过血脑屏障过程中起重要作用,表明 HBO 可以促进大鼠血脑屏障开放,增加水溶性药物脑组织浓度。本研究显示,两组大鼠血液顺铂浓度比较,差异无统计学意义,提示 HBO 可增加顺铂在脑组织中的分布,且对顺铂血液浓度无明显影响,可以避免全身毒性的增加。

C6 脑胶质瘤的血脑屏障包括血-脑脊液屏障与血-脑肿瘤屏障(blood-brain tumor barrier)及瘤周屏障,脑肿瘤组织渗透性的问题较为复杂,血-脑肿瘤屏障是导致化疗失败的重要因素^[11]。本研究观察脑瘤组织顺铂浓度随时间变化的规律,结果发现,HBO 组顺铂浓度于 5 min 至 8 h 之间均较对照组有显著增加($P<0.01$),药代动力学参数 C_{max} 、 AUC_{0-8h} 均明显高于对照组,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$),表明 HBO 可以有效提高药物肿瘤浓度。有研究报道,顺铂的抗肿瘤活性不仅取决于局部药物浓度,还与药物浓度维持时间有关^[12]。本研究发现,脑瘤组织中 $T_{1/2}$ 与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 HBO 治疗后,顺铂在脑瘤组织中消除速率减缓,滞留时间延长,有利于提高化疗效果。本研究还发现 HBO 延长顺铂脑瘤组织半衰期,对血液消除速率无明显作用。药物半衰期 $T_{1/2}$ 由外清除率与游离药物分布容积决定,若脑内药物的消除速率慢于血液中药物的消除速率,

脑内半衰期将延长,但不会影响全身药物的半衰期,因为脑内药物对全身药物的消除影响很小。

HBO 可增强肿瘤对放疗、化疗及光动力疗法等的敏感性^[13]。研究认为,HBO 治疗可减轻脑胶质瘤组织的缺氧程度,减少肿瘤内的乏氧区,使乏氧细胞减少、静止期细胞进入增殖期,增加药物对细胞的敏感性^[14]。本研究证实,对于脑肿瘤,HBO 还能增加血脑屏障开放、促进化疗药物进入肿瘤组织。HBO 作为一种辅助治疗手段,联合化疗药物可以发挥协同作用,在脑胶质瘤的综合治疗中具有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].北京:人民卫生出版社,2011:670-671.
- [2] 李咪咪,刘芳,陈佳,等.高压氧对大鼠血脑屏障通透性影响的实验研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2015,36(4):475-476.
- [3] 张荣,段美美. C6 大鼠脑胶质瘤动物模型建立及病理观察[J]. 世界中西医结合杂志,2013,8(1):73-75. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6613.2013.01.027.
- [4] 薛晖,陈荣,李洁. HPLC 法测定人血浆中顺铂的浓度及其药动学研究[J]. 中国药房,2012,23(38):3593-3595.
- [5] 任长虹,高明清,曹金强,等. 大鼠脑脊液抽取的新方法[J]. 实验动物科学,2012,29(1):61-62. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2012.01.016.
- [6] 姜海洋,杨杨,付建平,等. 选择性开放血脑屏障的相关方法研究[J]. 医学综述,2010,16(11):1661-1663. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2010.11.021.
- [7] 李咪咪,刘芳,刘亦伟,等. 高压氧联合冰片对大鼠血脑屏障丙戊酸钠透过率的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2014,36(9):667-670. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.09.003.
- [8] 林静,王曙光. 高压氧下氨甲喋呤透过血脑屏障的观察[J]. 中华航海医学杂志,1998,5(4):222. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-6906.1998.04.010.
- [9] 李红玲,房金勇,陈玉燕. 高压氧及其在中枢神经疾病治疗方面的进展[J]. 中华物理医学与康复杂志,2012,34(10):788-790. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.010.020.
- [10] Cevik NG, Orhan N, Yilmaz CU, et al. The effects of hyperbaric air and hyperbaric oxygen on blood-brain barrier integrity in rats[J]. Brain Res, 2013, 19(2):113-121.
- [11] 吴波,游潮,黄光富. 大鼠 C6 脑胶质瘤血-脑屏障的硝酸镉示踪电镜研究[J]. 中国临床神经外科杂志,2007,12(1):28-33. DOI: 10.3969/j.issn.1009-153X.2007.01.010.
- [12] Lesniak MS, Langer R, Brem H. Drug delivery to tumors of the central nervous system[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2001, 1(3):210-216.
- [13] 丁建波,秦智勇. 高压氧在脑胶质瘤治疗中的应用[J]. 中华神经外科杂志,2011,27(38):210-212. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2011.02.033.
- [14] Sun L, Marti HH, Veltkamp R. Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression in focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 2008, 39(3):1000-1006. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.490599.

(修回日期:2016-11-03)

(本文编辑:凌 琛)