

三尖杉酯碱正、负电荷脂质体在大鼠体内的分布

吴淮亮, 翁桐英, 周学敏, 程大敦 (南京药物研究所, 南京 210009, 中国)

R 879.1

Distribution of harringtonine positively and negatively charged liposome in rat tissues

WU Huai-Liang, WENG Guo-Ying, ZHOU Xue-Min, CHENG Da-Dun (*Nanjing Institute of Materia Medica, Nanjing 210009, China*)

ABSTRACT Distribution of harringtonine positively and negatively charged liposome (HL(+), HL(-)) and harringtonine free drug (HF) in rat tissues were measured by HPLC. Their LD₅₀ in mice were compared. The results showed that distribution of HL(+), HL(-) *In vivo* may be changed, that the amount of HL(+), HL(-) was increased in the liver, lung, and spleen and in these tissues it was 2-30-fold higher than that of HF after iv 2 h. HL(+), HL(-) may aid to permeate through the blood-brain, blood-testicle barrier, and to reduce acute lethan toxicity. Areas under the time curve of HL(+), HL(-) in brain and testis within 2 h were 2-4.5 times as much as those of HF. There were significant differences in the fate between negatively and positively charged liposomes *in vivo*.

KEY WORDS harringtonines; liposomes; tissue distribution; electric charge

摘要 用 HPLC 测定了 HL(+), HL(-) 和 HF 在大鼠体内的组织分布, 并比较了它们的急性毒性。HL(+), HF(-) 改变了组织分布, 可提高在肝、脾、肺等组织中的分布量, 2 h 时 HL(+), HL(-) 量是 HF 的 2.5-30 倍。HL(+), HL(-) 增加了血脑、血睾屏障的通透性并降低急性毒性, 2 h 内脑和睾丸组织中 HL(+), HL(-) 时间曲线下面积是 HF 的 2-4.5 倍。HL(+), HL(-) 组织分布也有较大差异。

关键词 三尖杉酯碱; 脂质体; 组织分布; 电荷

三尖杉酯碱(harringtonine, H)是从三尖杉属植物中分离到的抗肿瘤有效成份^[1]。对急性及慢性粒细胞

白血病、急性单核细胞白血病及红白血病均有肯定的疗效^[2]。但也具有毒性较大及易复发的缺点。脂质体可以改变多种药物在动物体内的组织分布^[3]。提高药物的选择性, 增加疗效和降低毒性^[4-6]。因而越来越受到重视。本文目的是比较三尖杉酯碱正、负电荷脂质体(harringtonine positively and negatively charged liposome, HL(+), HL(-))和游离三尖杉酯碱(harringtonine free-form, HF)在动物体内的组织分布及它们的急性毒性, 观察不同电荷的三尖杉酯碱脂质体是否能提高 H 在某些组织中的分布量, 能否促进 H 透过血脑屏障及血睾屏障, 为扩大 H 临床应用范围及临床合理用药提供依据。

MATERIALS

H, 常州健民药厂提供。H 注射液, 自制, 符合上海市药品标准 1980 年版。H 精制品, 中国医学科学院药物研究所提供。经 uv, IR, MS, HPLC 及熔点等纯度检查。卵磷脂, 本实验室自制。层析纯, 氧化指数 0.2 以下。十八胺、磷脂酸, 本所实验车间提供。层析纯。HL(+), HL(-) 按反相蒸发法^[7]自制。

高效液相色谱仪, 岛津 LC-5A, 微处理器, 岛津 CHROMATOPA CR-3A, 荧光检测器。岛津 RF-530, 内切式组织匀浆机 ZS 83-1, 浙江醇安机械厂。

METHODS AND RESULTS

急性毒性试验 昆明种小鼠, 体重 19.2 ± 1.2 g, 雌雄各半, 随机分 21 组, 每组 10 只。HF, HL(+), HL(-) 各 7 组。高低剂量比为 1 : 0.75, 尾静脉 iv, HL(+), HL(-) 和 HF 的给药剂量分别为: 2.52-14.18, 3.37-18.91, 1.42-7.98 mg·kg⁻¹, 给药后观察 10 d 内小鼠的反应和死亡率。由简化机率单位法计算 LD₅₀, 并将 HL(+), HL(-) 与 HF 比较, 其

Received 1991-11-13

Accepted 1992-05-25

95%的可信限为: HF, HL(+), HL(-)的 LD_{50} 分别为 4.3 ± 0.4 , 7.5 ± 0.8 和 $9.6 \pm 0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($P < 0.01$).

HL(+), HL(-)和 HF iv 在大鼠各脏器中的分布

Wistar 大鼠, σ , 3-4 月龄, 体重 $295 \pm 28 \text{ g}$. HL(+), HL(-)和 HF 各 6 组, 每组 3 只. iv HL(+), HL(-)和 HF 各 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. 在给药后不同时间, 断头, 取出脏器, 用生理盐水冲去浮血, 滤纸吸干, 按生物样品制备法^[6]提取 H, 通过 HPLC 测得各器官组织中的 H 含量(Tab 1). HL(+), HL(-)和 HF 在各器官中的分布量以 15 min 或 15 min 以前的点为最高, 随后迅速下降, 30 min 后下降趋势变缓. 很明显以脂质体形式给药, H 主要分布在网状内皮细胞丰富的组织中, 如肝、脾、肺等, 远高于以游离形

给药的分布量. iv HL 15 min 后, 肝、脾、肺中的 H 量高于 HF 的量 2.5-11 倍, 2 h 后, HL 与 HF 在各脏器中的分布量差异比初始时更大, 肝、脾中的 H 量比 HF 的高 10-30 倍, 肺中差异亦增大至 2.8-8.5 倍.

HL(+), HL(-)在各个器官每个时间点的分布量几乎均有显著差异. 在肺、脾、脑、睾丸中 HL(+)分布量比 HL(-)高 1.3-3.7 倍. 表明 HL(+)有可能提高对脑、脑、睾丸等组织的选择性.

iv HL(+), HL(-)和 HF 2 h 后, 脑、睾丸中 H 时间曲线下面积(Tab 2). 由 Tab 1, Tab 2 可知, 虽然 H 在脑、睾丸组织中的绝对量不高, 但脂质体与游离形相比, 其 H 时间曲线下面积, 在脑组织中 HL(+), HL(-)分别是 HF 的 3 倍和 2 倍, 在睾丸组织中, HL(+), HL(-)分别是 HF 的 4.5 倍和 2 倍.

Tab 1. Tissue distribution of harringtonine positively, negatively charged liposomes and harringtonine free-form (HL(+), HL(-), and HF) $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ each in rats after iv. $n=3$, $\bar{x} \pm s$.

* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs HF.

Time/ min	Type	Concentration of harringtonine in tissues, ng / g wet weight							
		Heart	Liver	Lung	Spleen	Kidney	Brain	Muscle	Testis
3	HF	2 350 $\pm$ 70	4 000 $\pm$ 400	1 040 $\pm$ 70	4 700 $\pm$ 400	21 500 $\pm$ 1 230	54 $\pm$ 4	1 403 $\pm$ 27	31 $\pm$ 1
	HL(+)	2 890 $\pm$ 170***	12 700 $\pm$ 1 100***	6 780 $\pm$ 180**	51 000 $\pm$ 400***	8 920 $\pm$ 138***	216 $\pm$ 3***	1 124 $\pm$ 19***	176 $\pm$ 6***
	HL(-)	3 070 $\pm$ 90***	15 920 $\pm$ 160***	3 340 $\pm$ 300***	29 900 $\pm$ 200***	22 000 $\pm$ 1 100*	108 $\pm$ 11***	1 270 $\pm$ 160*	102 $\pm$ 7***
77	HF	1 520 $\pm$ 50	4 400 $\pm$ 300	1 850 $\pm$ 60	3 400 $\pm$ 400	8 970 $\pm$ 220	46 $\pm$ 4	1 494 $\pm$ 23	42 $\pm$ 1
	HL(+)	1 730 $\pm$ 300*	14 700 $\pm$ 1 500***	6 600 $\pm$ 300***	56 000 $\pm$ 3 700***	7 790 $\pm$ 170***	167 $\pm$ 7***	1 280 $\pm$ 50***	204 $\pm$ 17***
	HL(-)	2 580 $\pm$ 50***	17 900 $\pm$ 1 500***	3 100 $\pm$ 210**	40 300 $\pm$ 1 000***	13 900 $\pm$ 600***	106 $\pm$ 9***	1 370 $\pm$ 30***	97 $\pm$ 9***
15	HF	1 840 $\pm$ 60	5 300 $\pm$ 500	873 $\pm$ 20	5 170 $\pm$ 170	8 500 $\pm$ 400	51 $\pm$ 2	2 000 $\pm$ 140	58 $\pm$ 8
	HL(+)	1 380 $\pm$ 50***	13 700 $\pm$ 400***	5 370 $\pm$ 230***	47 000 $\pm$ 4 800***	5 890 $\pm$ 200***	123 $\pm$ 10***	1 000 $\pm$ 60***	180 $\pm$ 13***
	HL(-)	1 600 $\pm$ 230**	19 400 $\pm$ 1 000***	1 440 $\pm$ 80***	56 000 $\pm$ 3 000***	7 700 $\pm$ 300**	89 $\pm$ 7***	1 200 $\pm$ 50***	94 $\pm$ 9***
30	HF	720 $\pm$ 60	1 690 $\pm$ 80	402 $\pm$ 25	1 940 $\pm$ 100	3 050 $\pm$ 240	45 $\pm$ 1	341 $\pm$ 24	44 $\pm$ 3
	HL(+)	689 $\pm$ 12*	9 800 $\pm$ 500***	2 690 $\pm$ 150***	42 000 $\pm$ 2 000***	2 730 $\pm$ 260**	150 $\pm$ 9***	200 $\pm$ 22***	165 $\pm$ 4***
	HL(-)	373 $\pm$ 12***	10 000 $\pm$ 600***	1 140 $\pm$ 80***	17 800 $\pm$ 900***	1 530 $\pm$ 130***	86 $\pm$ 6***	261 $\pm$ 29***	91 $\pm$ 10***
60	HF	399 $\pm$ 7	930 $\pm$ 80	158 $\pm$ 10	1 290 $\pm$ 100	1 040 $\pm$ 70	40 $\pm$ 1	258 $\pm$ 18	33 $\pm$ 2
	HL(+)	420 $\pm$ 50*	3 700 $\pm$ 700***	1 280 $\pm$ 100***	38 000 $\pm$ 5 000***	930 $\pm$ 70*	92 $\pm$ 4***	113 $\pm$ 12***	162 $\pm$ 4***
	HL(-)	157 $\pm$ 17***	8 000 $\pm$ 600***	400 $\pm$ 40***	15 400 $\pm$ 1 500***	397 $\pm$ 20***	63 $\pm$ 5***	120 $\pm$ 15***	64 $\pm$ 2***
120	HF	187 $\pm$ 12	550 $\pm$ 30	96 $\pm$ 6	818 $\pm$ 50	316 $\pm$ 28	28 $\pm$ 1	122 $\pm$ 6	31 $\pm$ 3
	HL(+)	252 $\pm$ 20***	5 750 $\pm$ 200***	800 $\pm$ 40***	24 000 $\pm$ 1 200***	250 $\pm$ 50**	76 $\pm$ 3***	91 $\pm$ 10***	159 $\pm$ 12***
	HL(-)	82 $\pm$ 8***	5 000 $\pm$ 400***	240 $\pm$ 30***	13 500 $\pm$ 1 700***	161 $\pm$ 14***	58 $\pm$ 3***	86 $\pm$ 2***	56 $\pm$ 4***

Tab 2. Areas under the time curve of HL(+), HL(-), and HF in brain and testis of rats within 2 h. $n=18$, $\bar{x} \pm s$, *** $P < 0.01$ vs HF.

	Area, min · $\mu\text{g/g}$ wet wt Brain	Testis
HF	3.98 ± 0.18	4.25 ± 0.20
HL(+)	$12.1 \pm 0.6^{***}$	$19.7 \pm 0.7^{***}$
HL(-)	$8.4 \pm 0.3^{***}$	$8.8 \pm 0.3^{***}$

DISCUSSION

上述结果表明 H 以脂质体给药, 明显地改变了组织处置模型, 提高了药物在某些组织中的分布量, 延长了在组织中滞留时间, 这将有可能会提高细胞周期特异药物的疗效。动物实验表明, H 对动物实体瘤也有效。利用脂质体可较大幅度提高 H 在肝、肺等组织中的药浓, 但 HL 是否对肝癌、肺癌有效有待进一步的药效学研究阐明。HL 与 HF 相比, 提示了脂质体具有增加药物透过血脑、血睾屏障的能力。这与我们研制的棉酚脂质体通过血睾屏障的能力明显大于游离棉酚的结果^[9]相一致。至于 HL 能否在脑、睾丸组织中达到有效药浓, 从而有助于降低白血病的复发率, 这仍需进一步的研究加以阐明。

HL(+)比 HL(-)在某些组织器官中有较长的滞留时间, 可能与十八胺对磷脂酰解酶有较强的抑制作用^[10]及其胺基与细胞膜上的酸性磷脂结合^[11]有关。这也说明改变脂质体表面性质可以改变含药脂质体的组织分布。

由于 H 的毒性较大, 限制了用药量, 使得体内分析方法必须有较高的灵敏度。同时 H 的紫外吸收系数相当小, HPLC-uv 法^[12]只有 μg 的灵敏度, 同位素计数法有较高的灵敏度, 但由于 ^3H 90% 标在 H 母核上^[13], 而 H 的抗癌活性基团是在易分解的侧链上, 用同位素法测得的是各组织中的总放射性, 并不是 H 的量。因此本文选用了 HPLC 荧光分析法, 并在动物实验中相对加大了给药剂量, 获得了较为满意的结果。

REFERENCES

- Powell RG, Weisleder D, Smith CR Jr. Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtoniae*: Structure and activity. *J Pharm Sci* 1972; 61 : 1227-30.
- Chinese People's liberation Army 187th Hospital. Harringtonine acute leukemias: clinical analysis of 31 cases. *Chin Med J* 1977; 3 : 319-24.
- Liu DX, Mori A, Huang LF. Large liposomes containing ganglioside GM₁ accumulate effectively in spleen. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1066 : 159-65.
- Dinney CPN, Bucana CD, Utsugi T, Fidler IJ, von Eschenbach AC, Killion JJ. Therapy of spontaneous lung metastasis of murine renal adenocarcinoma by systemic administration of liposomes containing the macrophage activator CGP 31362. *Cancer Res* 1991; 51 : 3741-7.
- Gondal JA, Swartz RP, Rahman A. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33 : 1544-8.
- Ralph ED, Khazindar AM, Barber KR, Grant CWM. Comparative *in vitro* effects of liposomal amphotericin B, amphotericin B-deoxycholate, and free amphotericin B against fungal strains determined by using MIC and minimal lethal concentration susceptibility studies and time-kill curves. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35 : 188-91.
- Tang LJ, Weng GY. Preparation and stability of liposome-associated harringtonine. *Acta Pharm Sin* 1985; 20 : 463-9.
- Wu HL, Zhou XM, Weng GY, Chen DD. Quantitation of liposomes containing harringtonine and of harringtonine in tissues of rat by HPLC. *J Chin Pharm Univ* 1989; 20 : 77-81.
- Wang JM, Weng GY, Zhang ZR, Wu XL, Jiang DH, Tao L, et al. The entry of gossypol across the blood-testis barrier in rats. *Contraception* 1989; 39 : 569-75.
- Steger LD, Desnick RJ. Enzyme therapy VI: comparative *in vivo* fates and effects on lysosomal integrity of enzyme entrapped in negatively and positively charged liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1977; 464 : 530-46.
- Yoshihara E, Nakae T. Cytolytic activity of liposomes containing stearylamine. *Biochim Biophys Acta* 1986; 854 : 93-101.
- Lu XL, Zhang SL, Wang ZS, Wang MZ. HPLC separation and determination of cephalotaxus alkaloids. *Acta Pharm Sin* 1981; 16 : 773-8.
- Ji XJ, Liu JS, Liu ZM. Metabolism of harringtonine. *Acta Pharm Sin* 1979; 14 : 234-40.

1 Powell RG, Weisleder D, Smith CR Jr. Antitumor