



多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液 大鼠重复给药毒性的比较

张颖¹, 马玉奎², 戴晓莉²

(1. 山东省临朐县人民医院, 山东 临朐 262600; 2. 山东省药学科学院, 济南 250100)

【摘要】 目的 研究大鼠连续静脉注射给予多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液后对大鼠产生的毒性作用及毒性异同比较。方法 SD大鼠90只,随机分为溶剂对照组、多柔比星脂质体注射液(1 mg/kg)和多柔比星注射液(1 mg/kg)组。各组大鼠每3 d静脉注射1次,连续给药13次,检测其体重、血液生化学、血液学、脏器系数等指标,并进行组织病理学检查。结果 多柔比星脂质体注射液1 mg/kg可引起SD大鼠脱毛和溃疡,体重增长明显延缓,PLT、ALT、BUN升高,ALB降低,心脏和肾脏系数增大,胸腺和睾丸系数减小,组织病理学检查结果显示睾丸曲细精管生精上皮脱落,各级生精细胞消失,部分间质水肿;心脏心肌纤维断裂、溶解,横纹及部分细胞核消失;肾脏出现肾小管透明管型等病理组织学病变。与多柔比星脂质体注射液比较,相同剂量下多柔比星注射液亦可引起以上病变,但大鼠脱毛和皮肤溃疡率降低,肾脏毒性和心脏毒性明显增加。结论 多柔比星脂质体注射液与普通注射液比较,心脏和肾脏毒性明显减轻,但皮肤毒性明显增加。

【关键词】 多柔比星注射液;脂质体;SD大鼠;重复给药毒性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0023-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.005

Comparison of the repeated dose toxicity of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection in rats

ZHANG Ying¹, MA Yu-kui², DAI Xiao-li²

(1. The People's Hospital of Linqu County, Linqu 262600, China;

2. Shandong Provincial Academy of Pharmaceutical Science, Jinan 250033)

【Abstract】 **Objective** To investigate the repeated dose toxicity of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection in rats. **Methods** Ninety SD rats (body weight 180–220 g, male:female = 1:1) were divided into 3 groups (30 rats in each group), and were administered intravenously with physiological saline, doxorubicin liposome injection (1 mg·kg⁻¹) and doxorubicin injection (1 mg·kg⁻¹), respectively, once every three days for thirteen times. The body weight, blood biochemistry, hematology, organ coefficient and histopathology were analyzed for the overall toxicity assessment. **Results** The rats administered with doxorubicin liposome injection (1 mg/kg) showed hair loss and skin ulcer, significantly reduced growth of body weight, increased levels of urea nitrogen (BUN), alanine aminotransferase (ALT), blood platelet (PLT), and kidney and heart coefficients, decreased thymus and testicular coefficients, myofibrillar rupture and lysis, and partial loss of cell nuclei, hyaline casts in the renal convoluted tubules, interstitial edema and loss of spermatogenic cells in the testicular tubules. Compared with the doxorubicin liposome injection group, similar abnormal changes were also observed in the doxorubicin injection group, but the hair loss and skin ulcer were milder

【基金项目】 山东省自主创新及成果转化专项(2014ZZCX02104)。

【作者简介】 张颖(1972 -),女,主管药师,研究方向:药物不良反应检测。E-mail:449221076@qq.com。

【通讯作者】 马玉奎(1975 -)男,副主任药师,博士,研究方向:药物临床前安全性评价。E-mail:yukuima@sina.com。

and the heart and kidney toxicities were severer. **Conclusions** Compared with doxorubicin injection, the doxorubicin liposome injection causes milder heart and kidney toxicity but more serious skin toxicity.

【Key words】 Doxorubicin injection; Doxorubicin liposome; SD rat; Repeated dose toxicity

脂质体是近年来药剂领域研究非常活跃的一种新型制剂,是由脂质双分子层形成的粒径在纳米级别的囊泡,可将毒副作用大、在血液中稳定性差、降解快的药物包裹在脂质体内,携带药物到达特定的靶组织器官后再把装载的药物释放出来,达到靶向治疗的目的,从而可以提高疗效,降低毒副作用^[1]。目前脂质体制剂主要用于抗癌药物、疫苗以及核酸类药物。多柔比星脂质体注射液,是将一线治疗肿瘤药物多柔比星经包封制备成的纳米级长循环脂质体,制成后的脂质体大大降低了多柔比星普通制剂存在的心脏毒性问题,起到了减毒、增效的效果^[2]。本试验通过 SD 大鼠重复静脉给予多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液,通过检测血液学、血液生化学及病理学等指标,全面评价脂质体和普通制剂的毒性及毒性差异,为临床应用中的不良反应监测提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及实验环境:SPF 级 SD 大鼠 90 只,体重 180g~220 g,雌雄各半,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2007-0001】。饲养于 SPF 级环境,室温 20℃~26℃,湿度 40%~70%,日温差≤4℃。实验动物使用许可证号【SYXK(鲁)2010 0004】。

1.1.2 药品与试剂:多柔比星脂质体注射液(山东省药学科学院提供,批号 20110312);多柔比星注射液(先灵葆雅(中国)有限公司提供,批号 102369013);血液学检测试剂盒(济南荣辰医学科技有限公司提供);血凝检测试剂盒(上海太阳生物技术有限公司提供);血液生化学检测试剂盒(宁波瑞源生物科技有限公司提供)。

1.1.3 仪器:Sysmex XT-2000IV 型全自动血球计数仪(Sysmex Corporation 生产);日立 7180 全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术生产);Sysmex CA1500 全自动血凝分析仪(Sysmex Corporation 生产);TB718 包埋机、TK-218 摊烤片机(湖北孝感医疗器械公司生产);RM2235 切片机、DMLS2 显微镜(Leica 公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药:健康 SD 大鼠 90 只,雌雄各半,随机分为 3 组,即溶剂对照组、多柔比星脂质体注射液(1 mg/kg)和多柔比星注射液(1 mg/kg)组,给药体积 10 mL/kg,溶剂对照组静脉给予等容积生理盐水,每 3 d 给药 1 次,连续给药 13 次,停药恢复 4 周。

1.2.2 剂量设计依据:根据预试验结果设计正式试验剂量。大鼠 30 只,随机分成 3 组,分别为多柔比星注射液 1.5、1.0、0.5 mg/kg 三个剂量组,静脉给药,每 3 d 给药 1 次,共给药 13 次。结果显示,0.5 mg/kg 剂量组 10 只动物全部存活,体重及摄食量下降;1.0 mg/kg 剂量组 10 只动物全部存活;1.5 mg/kg 剂量组于给药 8 次后死亡 2 只。根据预试验采用动物能够耐受的剂量 1 mg/kg 进行正式毒性比较试验研究。

1.2.3 指标检测和结果评价:每 3 天称量 1 次体重和摄食量,每天观察大鼠外观体征。末次给药后 72 h 每组取 20 只动物,恢复期结束取 10 只剩余动物腹主动脉采血进行血液学及血液生化学检测,戊巴比妥钠安乐处死后,剖检摘取心、肝、脾、肺、肾等主要脏器称重并计算脏器系数(脏器系数=脏器重量/体重×100,单位为 g/100 g 体重)。所有脏器福尔马林溶液固定,常规 HE 染色,进行病理组织学检查。

1.2.4 统计学方法:各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般体征观察

溶剂对照组动物未出现任何异常反应。多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液组分别约 58% 和 34% 的动物皮肤出现不可逆性脱毛。多柔比星脂质体注射液组 25% 动物出现皮肤可愈性溃疡,多柔比星注射液组动物亦出现皮肤可愈性溃疡,但比例明显减少,为 8%。除脱毛和溃疡外未见其它异常反应。

2.2 体重及摄食量影响

与溶剂对照组比较,多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液 1 mg/kg 剂量下均可使雄性 SD 大鼠体重增长明显减缓;对雌性大鼠体重影响较小,

与溶剂对照组比较体重增长略有缓慢。多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液比较,相同剂量下对大鼠体重影响基本一致,无明显差异。两者对动物摄食量无明显影响(图 1)。

2.3 血液学和血液生化学指标影响

给药结束时,与溶剂对照组比较,多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液两组大鼠血液学指标中 PLT 升高;血液生化学指标中 ALB 降低,BUN 和 ALT 升高。恢复期结束时两组动物血液生化学指标未见明显恢复,ALB 降低,BUN 和 ALT 升高,血液学异常指标恢复正常。其他指标给药结束和恢复期结束未见异常。多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液比较,相同剂量下对大鼠以上指标的影响基本一致,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

2.4 脏器系数的影响

与溶剂对照组比较,多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液两组大鼠给药结束和恢复期结束

心脏和肾脏系数增大,胸腺系数减小;恢复期结束时雄性大鼠睾丸和附睾系数减小。其它脏器系数未见异常。多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液比较,相同剂量下对大鼠脏器系数影响基本一致,无统计学差异($P > 0.05$)。见表 2。

2.5 组织病理学检查结果

病理学检查结果显示,多柔比星注射液组 40% 动物出现肾脏病变,主要表现为肾脏皮髓交界处肾小管内可见均质、无结构的嗜伊红染物质,为肾小管透明管型;30% 动物出现心脏病变,表现为心肌纤维断裂、溶解,横纹及部分细胞核消失;而多柔比星脂质体注射液组动物出现肾脏和心脏病变的比率分别为 20% 和 3%,病变表现相同,但病变比率明显低于多柔比星注射液组。两者出现睾丸毒性的比例均为 20% 左右,主要表现为睾丸曲细精管生精上皮脱落,各级生精细胞消失,部分间质水肿。心脏和肾脏病变给药结束和恢复期结束均出现,睾丸病变均出现在恢复期结束。病变组织病理组织切片见图 2。

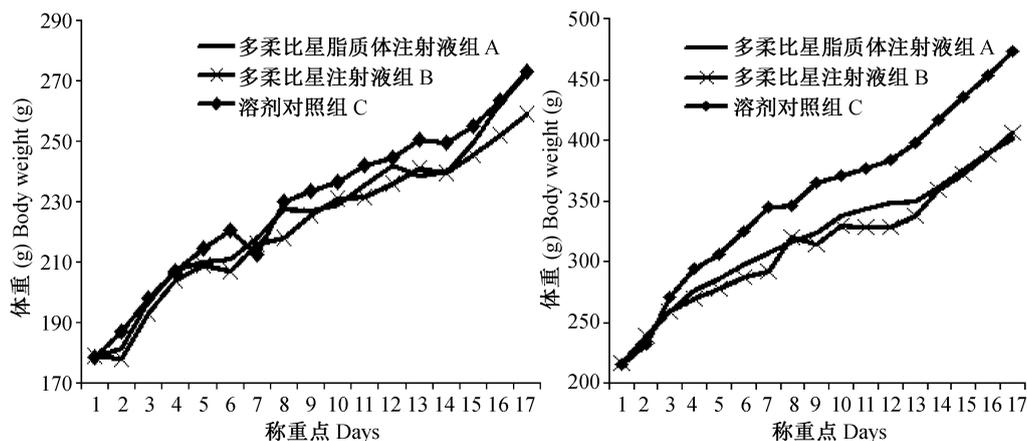


图 1 多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液对大鼠体重的影响

Fig. 1 Effects of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection on body weight of the rats

表 1 多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液对大鼠血液学和血液生化学指标的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection on blood biochemistry and hematology of the rats($\bar{x} \pm s$)

异常指标 Abnormal indexes	多柔比星脂质体 注射液组 Doxorubicin liposome injection	多柔比星 注射液组 Doxorubicin injection	溶剂 对照组 Solvent control
给药结束 End of dosing PLT ($10^9/L$)	1191 \pm 163 *	1166 \pm 108 **	986 \pm 179
ALB (g/L)	34.22 \pm 2.92 **	33.27 \pm 2.79 *	37.09 \pm 1.77
BUN (mmol/L)	8.76 \pm 1.72 *	9.78 \pm 2.44 **	6.62 \pm 0.92
ALT (U/L)	72.81 \pm 7.94	70.34 \pm 7.58	39.49 \pm 7.99
恢复期结束 End of recovery			
ALB (g/L)	35.54 \pm 1.63 *	33.31 \pm 1.72 *	37.36 \pm 1.15
BUN (mmol/L)	8.49 \pm 1.98 *	8.95 \pm 2.73 *	6.06 \pm 0.81
ALT (U/L)	60.75 \pm 15.16	63.95 \pm 12.60 *	46.51 \pm 8.49

注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. 溶剂对照组; $P > 0.05$, 多柔比星脂质体注射液组 vs. 多柔比星注射液组。

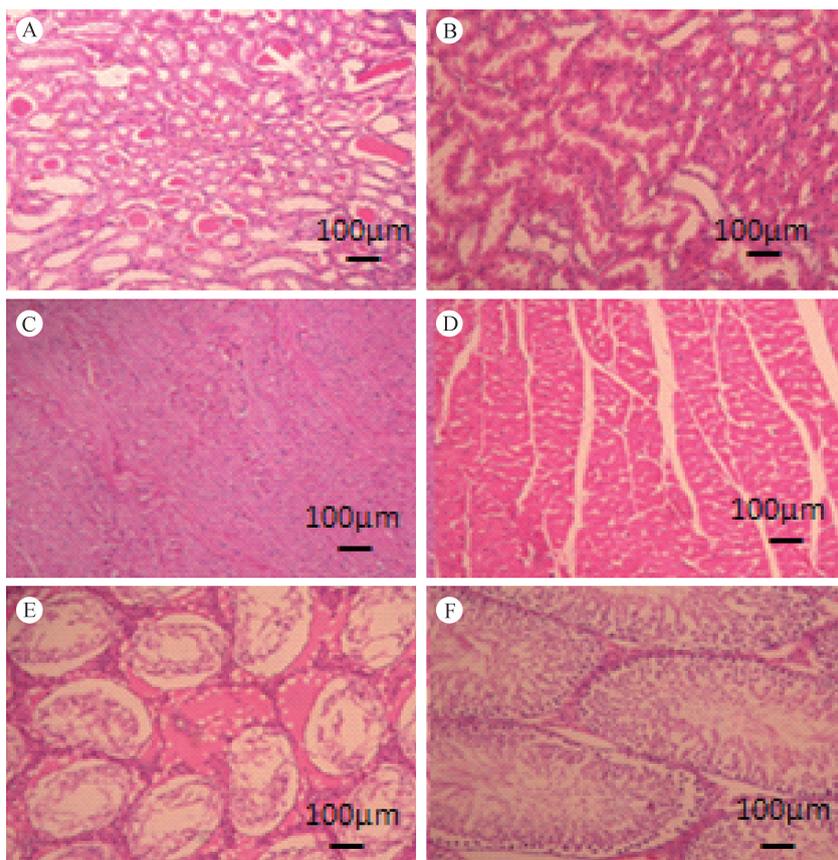
Note: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. the solvent control group; $P > 0.05$, doxorubicin liposome injection group vs. doxorubicin injection group.

表 2 多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液对大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s$, g/100g 体重)Tab. 2 Effects of doxorubicin liposome injection and doxorubicin injection on the organ coefficients of rats($\bar{x} \pm s$, g/100 g body weight)

异常指标 Abnormal indexes	多柔比星脂质体 注射液组 Doxorubicin liposome injection	多柔比星 注射液组 Doxorubicin injection	溶剂 对照组 Solvent control
给药结束 End of dosing			
心脏 Heart	0.372 ± 0.037 *	0.386 ± 0.055 *	0.321 ± 0.032
肾脏 Kidney	1.167 ± 0.126 *	1.332 ± 0.180 **	0.812 ± 0.072
胸腺 Thymus	0.087 ± 0.053 *	0.086 ± 0.031 **	0.162 ± 0.027
恢复期结束 End of recovery			
心脏 Heart	0.348 ± 0.042 *	0.356 ± 0.024 *	0.293 ± 0.040
肾脏 Kidney	1.022 ± 0.082 *	1.245 ± 0.389 *	0.738 ± 0.022
胸腺 Thymus	0.101 ± 0.016 *	0.103 ± 0.018 *	0.151 ± 0.032
睾丸 Testicle	0.303 ± 0.035 **	0.282 ± 0.019 **	0.747 ± 0.059
附睾 Epididymis	0.284 ± 0.069 *	0.273 ± 0.087 *	0.370 ± 0.046

注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs 溶剂对照组; $P > 0.05$, 多柔比星脂质体注射液组 vs 多柔比星注射液组。

Note. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. solvent control group; $P > 0.05$, doxorubicin liposome injection group vs. doxorubicin injection group.



注: A: 病变肾脏; B: 正常肾脏; C: 病变心脏; D: 正常心脏; E: 病变睾丸; F: 正常睾丸。(标尺 = 100 μm)

图 2 组织病理学 HE 染色结果

Note. A. Lesions in the kidney; B. Normal kidney; C. Lesions in the heart; D. Normal heart; E. Lesions in the testis; F. Normal testis. (Bar = 100 μm).

Fig. 2 Histological changes of the rat kidney, heart and testicle. HE staining

3 讨论

肾脏是外源性化合物毒作用最常见的靶器官之一,主要因为肾脏是全身血流量最大的器官,血中有害物质可流进肾脏,特别肾皮质。肾脏的浓缩和蓄积能力可将血浆中浓度较低的毒物高度浓缩并沉积在肾小管细胞内。肾脏的内皮细胞网亦为毒物引起的免疫性内皮细胞损伤提供了结构基础^[3]。本研究中,多柔比星注射液和多柔比星脂质体注射液组大鼠血清中 BUN 明显升高,而 BUN 是肾脏损伤的特异性指标^[4],同时肾脏系数增大,病理学检查结果显示肾脏发生组织病理学改变,充分证明肾脏是两者共同的靶器官。

肝脏是人体主要的解毒器官,大部分药物需在肝脏代谢活化或灭活,故容易成为药物的毒作用靶点。ALB 是肝脏合成的水溶性蛋白质,是血中主要的运输蛋白,血清中含量最高,白蛋白只能够在肝脏合成,可用于判断肝脏损伤程度的指标。如果肾损伤,白蛋白将大量流失到体外,亦可引起含量降低。ALT 是肝细胞损伤释放到血液中的酶,肝、肾、心肌等几乎所有的脏器组织细胞中都有,特别在肝脏含量较高。与 AST 相比,在其它脏器中的分布量较少,可以用于肝损伤的特征指标^[4,5]。本研究结果显示,多柔比星注射液和多柔比星脂质体注射液组大鼠血清中 ALB 显著降低,ALT 明显升高,但病理学检查未见病变,说明两者可引起肝脏功能损伤,无器质性病变。

研究结果还显示,多柔比星注射液和多柔比星脂质体注射液还可引起大鼠不同程度的脱毛、皮肤溃疡、血液中 PLT 减少,心脏、胸腺和睾丸系数增加,心脏和睾丸发生病理组织学病变。睾丸系数增加和病理组织学病变均发生在恢复期结束,说明睾丸毒性损伤有一定的滞后效应。综合试验结果分析,多柔比星注射液和多柔比星脂质体注射液的毒性靶器官一致,均为皮肤、血液系统、肝脏、肾脏、心脏、胸腺和睾丸。

本研究的目的是研究多柔比星脂质体注射液和多柔比星注射液的毒性并加以比较。为充

分暴露药物的毒性,本研究采用动物能够耐受的剂量 1 mg/kg 长时间重复给药。试验结果显示,尽管两者的毒性靶器官一致,但毒性程度存在明显差异。皮肤毒性体现在脱毛和皮肤溃疡,多柔比星脂质体注射液发生率分别为 58% 和 25%,明显高于多柔比星注射液的 34% 和 8%。肾脏和心脏病理学检查结果显示,多柔比星脂质体注射液病变率分别为 20% 和 3%,明显低于多柔比星注射液的 40% 和 30%。两者对肝脏、血液系统、胸腺和睾丸的毒性基本一致,未存在明显差异。初步分析原因为多柔比星脂质体制剂同普通制剂相比,体内代谢行为可能会有较大的改变,比如可提高药物的皮肤靶向性、肿瘤组织的分布等。同时脂质体因具有低渗透性类脂基质与内部水性缓冲系统,两者协同可保持多柔比星在血液循环中处于包裹状态,只有渗入组织后,多柔比星才开始起效,因此可减少全身系统暴露,减少全身系统毒性^[6,7]。这种改变可能会带来有利的一面,如降低多柔比星注射液的心脏和肾脏毒性,但同时也可能带来不利的一面,如增加皮肤毒性等。

参考文献:

- [1] 李祥,杜俊,向小四,等. 脂质体在抗肿瘤药物中的应用研究进展 [J]. 中南药学, 2014, 10(4): 290 - 294.
- [2] 贾晋斌,韦青燕. 阿霉素脂质体的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2011, 2(5): 372 - 375.
- [3] 李波,袁伯俊,廖明阳. 药物毒理学(第一版) [M]. 北京:人民卫生出版社. 2015: 134 - 149.
- [4] 周宗灿. 毒理学教程(第3版) [M]. 北京:北京大学医学出版社. 2006: 409 - 427.
- [5] 贺蕾艳,郭瑶雪,李春,等. 药物性肝损伤生物标志物研究进展 [J]. 药学报, 2015, 50(8): 959 - 965.
- [6] 文旭,范健. 脂质体多柔比星药物动力学研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2001, 20(3): 216 - 218.
- [7] 秦燕,徐智儒,王向伟,等. PEG 化脂质体多柔比星在动物体内的药动学及组织分布 [J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(8): 596 - 599.

[修回日期]2016-02-23