泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1154-03

超声微泡对大鼠前列腺中药物浓度的影响

魏武然[1],张唯力[1],戴君勇[1],刘 颖[1],王志刚[2],冉海涛[2]
(1.重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010;2.重庆医科大学超声影像学研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:利用超声白蛋白微泡造影剂经一定声压超声辐照后产生的"声孔效应"(Sonoporation),以及其靶向性来提高前列腺内的药物浓度。方法:选取已建立慢性前列腺炎模型大鼠 30 只,随机分为对照组,给药组和给药加微泡组。将 EA-10 原料药以溶媒溶解后注射给药。对照组给予生理盐水,给药组以 15 mg/kg 剂量给药,微泡组以 15 mg/kg 剂量给药,给药后微泡尾静脉注射并用超声基因转染仪前列腺局部间歇辐照 2 min。照射后取前列腺组织,匀浆后测量组织中 EA-10 的浓度变化。结果:对照组前列腺组织中没有药物,给药组和给药加微泡组前列腺组织中药物浓度较对照组高($P<0.01$),给药加微泡组前列腺组织中药物浓度较给药组高($P<0.05$)。结论:超声白蛋白微泡造影剂的"声孔效应"对于前列腺组织药物浓度的提高有明显的促进作用。

【关键词】舍尼通;药物浓度;大鼠;超声;微泡;前列腺;EA-10
【中国图书分类法分类号】R697.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-15

Experimental study on the influence of ultrasound-mediated microbubble on the medicine concentration in rat prostate

WEI Wu-ran, et al
(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To increase the medicine concentration in rat prostate by the "sound aperture effect" and site-targeted effect of ultrasound-Mediated Microbubble in order to get better therapeutic effect. *Methods*: 30 1-year-old male Sprague-Dawley rats were castrated and injected estradiol benzoate for 30 days and divided into three groups randomly, model group, treatment group and ultrasound-mediated microbubble group. Model group was treated with sodium chloride, treatment group was treated with EA-10 and ultrasound-mediated microbubble group was given ultrasound-mediated microbubble and EA-10. Concentration of EA-10 in prostate was measured after the prostate was taken and homogenated. *Results*: Concentration of EA-10 in treatment group as higher than that of in model group ($P<0.01$). But more EA-10 was measured in ultrasound-mediated microbubble group than in treatment group ($P<0.05$). *Conclusion*: Ultrasound-mediated microbubble can markedly promote the increase in the drug concentration in rat prostate.

【Key words】Cernilton; Medicine concentration; Rat; Ultrasound; Microbubble; Prostate; EA-10

慢性非细菌性前列腺炎主要发生于中青年男性人群,表现为尿频、尿急、尿痛、排尿不尽、排尿困难等排尿异常症状,会阴部、下腹部、阴茎阴囊、腰骶部等部位不适或疼痛等症状。由于前列腺包膜组织的屏障及血-前列腺屏障的存在,目前,常规的药物治疗较难在前列腺内形成有效治疗浓度,从而影响治疗效果。如何增加前列腺组织的通透性,在前列腺组织内达到有效的药物浓度一直是慢性前列腺炎治疗研究的难点。

作者介绍:魏武然(1981-),男,博士,研究方向:前列腺炎。
通讯作者:张唯力,男,教授,E-mail:66zwl@sina.com。
基金项目:国家自然科学基金重点项目资助(30430230)。

EA10 具有通过抑制环加氧酶和脂加氧酶的活性,阻断白细胞三烯至花生四烯酸代谢途径,抑制内源性炎症物质合成,可以使大鼠前列腺内细胞因子的水平下降,对于大鼠慢性非细菌性前列腺炎有良好的抗炎治疗效果。临床研究也显示,EA10 对于男性慢性非细菌性前列腺炎有较明显疗效,基于国内外的研究,我们选择 EA10 作为治疗大鼠慢性非细菌性前列腺炎的药物。

超声微泡造影剂最初被设计用于疾病的诊断,近来的研究表明可以将微泡造影剂作为携带药物或治疗性基因的载体。1997 年 BAO 发现,中华田鼠卵巢细胞的含微泡悬浮液经超声辐照后,细胞膜可以对大分子暂时开放,随后闭合,大分子可以进

入细胞并被细胞俘获,他称此现象为"声孔效应"(Sonoporation),又叫"空化效应"[1]。造影剂微泡的平均直径小于红细胞直径,因而能够自由运行于微循环。Qian 等人的研究发现超声波声孔效应可引起细菌细胞膜的通透性增强,使庆大霉素更容易进入菌体内[2]。所以我们设想利用含超声白蛋白微泡造影剂悬浮液的"声孔效应",以及其靶向性和炎症部位聚集的特异性来提高前列腺内的药物浓度,达到更好的治疗目的。

1 材料和方法

1.1 材料

1 周岁 SD 大鼠 30 只,雄性,清洁级,体重 350~450 g。EA-10 原料药,南京美瑞制药有限公司馈赠,批号 575105602。超声白蛋白微泡造影剂(微泡浓度为 8.3×10^8 个/ml,微泡直径为(2.7±0.8)μm)重庆医科大学超声影像学研究所馈赠。UGT1025 型超声基因转染仪,超声强度为 0.25~2.5 W/cm² 可调,频率为 1 MHz,重庆医科大学超声影像学研究所研制。

1.2 方法

1.2.1 分组 用魏武然等[3]的方法建立动物模型,选取已建立慢性前列腺炎模型大鼠 30 只,随机平均分为 3 组,分别为对照组、给药组和给药加微泡组。

1.2.2 给药方案 将 EA-10 原料药以溶媒溶解后注射给药。对照组给予生理盐水 10 ml/kg 尾静脉注射,给药组以 15 mg/Kg 剂量经尾静脉注射给药,给药体积 10 ml/kg(溶媒组成:DMSO-PEG 400-水 10:45:45)。给药加微泡组以 15 mg/kg 剂量经尾静脉注射给药,在给药 5 min 后微泡 2 ml/kg 尾静脉注射并用超声基因转染仪以 1 MHz,0.5 W/cm² 的照射强度进行前列腺局部间歇辐照 2 min,作用时间为 5 s,间歇 5 s。

1.3 实验步骤

照射结束后立即取各组大鼠前列腺组织,处理后检测组织中 EA-10 的浓度。

1.3.1 溶液的制备 药品对照溶液:取 EA-10 原料药 50 mg,于 50 ml 棕色量瓶中。加氯仿溶解并稀释制成约 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/ml 的溶液作为对照品溶液。在无菌条件下取各组大鼠前列腺组织,每只大鼠前列腺分别剪碎后称取 0.3 g,准确至 0.000 1 g,分次加入共 6%高氯酸 20 ml 匀浆离心后加 15%三氯乙酸 4 ml 沉淀其蛋白质,过滤于 100 ml 三角瓶中。将沉淀物用 6%高氯酸 15 ml 再次匀浆离心,加 15%三氯乙酸 4 ml 沉淀其蛋白质,过滤,合并两次上清液,用 5.0 mol/L 和 0.5 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 6.5,转移至 50 ml 容量瓶中,定容摇匀。

1.3.2 浓度测定 药品对照溶液反应值(As)的测定:精密吸取醋酐 2 ml,置具塞试管中,加硫酸 1 滴,立即精密加入约 0.2 mg/ml 的药品对照溶液 1 ml,置旋涡振荡器中混均后,再立即倒入比色池中进行反应,并同时于 625 nm 波长处观察其反应的吸收度变化情况,记录最大吸收度 As 值,其中以氯仿 1 ml 代替上述反应中的对照品溶液,同法操作,作为空白对照。

前列腺匀浆溶液反应值(At)的测定:以精密加入前列腺匀浆溶液 1 ml 代替上述 As 测定中的药品对照溶液,同法操作,记录最大吸收度 At 值。而以氯仿 2 ml 代替其中的醋酐同法操作,作为空白对照。

测定后,按比色法原理计算出前列腺中 EA-10 的含量,即可计算出前列腺中 EA-10 的浓度。

1.3.3 标准曲线的绘制 EA-10 的线性测定:取已知含量的 EA-10 原料药 50 mg,精密称定,置 50 ml 棕色量瓶中,加氯仿溶解并稀释至刻度,制成含 EA-10 约 50、100、200、300、400 μg/ml 的溶液。精密吸取各溶液 1 ml,分别按上述 At 测定的方法操作,同样得到一条基本过原点的直线,线性回归方程为:A =0.002 3C+0.000 2,r= 0.999 7。

1.3.4 精密度试验 取 EA-10 原料药适量,由两操作者,各使用两台不同型号紫外分光光度计,在数天内经多次进行 EA-10 的含量测定。计算日内差(RSD = 0.67,n= 5)和日间差(RSD=1.60,n=6)结果表明本方法精密度好。

1.3.5 药品溶液和前列腺匀浆溶液的稳定性 取室温避光放置的约 0.2、1 mg/ml 药品溶液,分别于 5 日内每间隔 24 h 重复测定,结果测定值不变,所以药品溶液可在 5 日内避光室温放置使用。取室温避光放置的前列腺匀浆溶液。24 h 内测定,结果 EA-10 含量不变。

1.3.6 统计学方法 应用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,各组数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组之间比较采用单因素方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

本实验最终对药品对照溶液反应值(As)和前列腺匀浆溶液反应值(At)测定后可以计算出前列腺匀浆溶液的 EA-10 的浓度,浓度结果用均数±标准差表示。分析结果为对照组大鼠前列腺内无药物存在,给药组和给药加微泡组大鼠前列腺内药物浓度均明显高于对照组(P<0.01),加微泡组大鼠前列腺内药物浓度高于给药组(P<0.05)。

结果见下表 1。

3 讨 论

慢性前列腺炎是泌尿外科的常见病。由于前列腺包膜组织的屏障及血-前列腺屏障的存在,常规的药物治疗较难在前列腺内形成有效的治疗浓度,是前列腺炎药物治疗疗效不佳的重要原因[4]。影响药物进入前列腺组织主要有下面几个因素:①被膜屏障。前列腺是由腺组织和间质构成,并由结缔组织和平滑肌构成的被膜包裹。被膜、腺组织和间质等结构形成了一道药物难以进入的解剖屏障,且血管分布在被膜外面,所以前列腺发生慢性炎症时大

表 1 超声微泡对 EA-10 吸收影响的结果($\bar{x}\pm s$)

组别	数目	吸光度	浓度(μg/ml)
对照组	10	-	-
给药组	10	$0.027\pm0.007^{**}$	$11.35\pm2.85^{**}$
加微泡组	10	$0.036\pm0.008^{**\triangle}$	$15.26\pm3.57^{**\triangle}$

部分药物不能向病灶内扩散。②血前列腺屏障。血前列腺屏障是血液和前列腺之间由毛细血管内皮细胞构成的结构,细胞之间连接紧密,一方面可阻止病原体等外源物质的侵入,另一方面也令许多药物难以穿越,组织内药物浓度不容易达到有效浓度,从而难以达到治疗的目的。因此,如何增加前列腺组织的通透性,使药物能够通过血前列腺屏障,在前列腺组织内达到有效的药物浓度一直是慢性前列腺炎治疗研究的难点。

超声微泡造影剂最初被设计用于疾病的诊断,近来的研究表明将微泡造影剂作为携带药物或治疗性基因的载体,利用超声波的照射作用,可以实现药物的靶向导入和释放。Skyba 等[5]在大鼠脊斜肌微循环的研究中发现,注射微泡后在强的超声能量作用下,微泡的破灭将同时破坏毛细血管内皮的完整性。这一现象有利于微泡所携带的药物渗出血管外,进入细胞,提高微泡的靶向治疗作用。空化效应所致的可修复性声孔效应使得细胞膜表面出现短暂的小孔,某些大分子物质(如基因和药物等)得以进入细胞内,增加细胞内的药物和外源基因浓度,提高治疗效率[6]。冉海涛等研究超声空化作用对体外培养细胞细胞膜的生物学效应,发现超声破坏微泡所产生的空化效应使细胞膜上出现可逆性小孔,致细胞膜的通透性增高。空化效应瞬间产生的"冲击波"(Shock wave)使细胞膜表面出现可逆性小孔,提高了细胞膜的通透性,外源基因因此能较容易地经细胞膜上的小孔进入细胞内,从而增强外源基因的摄取、转染和表达[7]。造影剂微泡的平均直径小于红细胞直径,因而能够自由运行于微循环。将药物吸附或包裹到超声微泡内,利用超声照射后的空化作用使细胞膜通透性增加,内皮细胞间隙增大,从而减少生物膜的屏障作用,使药物容易达到有效浓度[8]。

本实验结果显示对照组前列腺内无药物,给药组的药物浓度低于给药加微泡组,差异有显著性意义。表明通过给予超声白蛋白微泡造影剂对大鼠前列腺部位进行靶向作用,可以增加局部血管内皮的通透性,从而增加局部药物的浓度,使治疗的效果增加。实验证明利用超声微泡可以消除或者减弱血前列腺屏障对药物转运的限制,还可以将药物选择性地靶向输送到病变部位,在前列腺疾病的治疗中可能具有应用前景。实验根据文献报道采用 625 nm 波长对于 EA-10 的测定是很有效的[9,10]。在动物实验中,首先由肿瘤坏死因子 TNF-α 刺激小鼠血管产生炎症反应,然后静注微泡造影剂,超声显像发现微泡积聚于炎症部位[11]。本实验通过对大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型进行给药,并给予超声微泡进行干预,超声微泡到达预定部位后,通过低频,高能量超声照射,可以使微泡破裂,产生冲击波使细胞产生声孔,毛细血管内皮细胞间隙增宽,利于药物进入细胞内,从而提高局部组织药物浓度。实验结果显示超声微泡对大鼠前列腺局部药物浓度的提高是有效的,表明超声微泡在突破血前列腺屏障方面有其独特的优势,从而可能为临床上治疗前列腺炎提供了一种较好的手段。

参 考 文 献

[1] Bao S, Thrall B D, Miller D L, et al. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro[J]. Ultrasound Med Biol, 1997, 23(6):953-959.

[2] Qian Z, Sagers R D, Pitt W G. Investigation of the mechanism of the bioacaustic effect[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 44(2):198-205.

[3] 魏武然,张唯力,戴君勇.大鼠慢性非细菌性前列腺炎模型的建立[J].中国男科学杂志,2006,20(1):22-24.

[4] Wientjes M G, Zheng Z H, Hu L J, et al. Intraprostatic chemotherapy: distribution and transport mechanisms[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(11):4204-4211.

[5] Skyba D M, Price R J. Linka A Z, et al. Direct in vivo visualization ofintmvascular destruction of mi crobubbles by ultrasound and its local effects on tissue[J]. Circxthtion, 1998, 98(4):290-293.

[6] Miller D L, Quddus J. Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(18):10179-10184.

[7] 冉海涛,任 红,王志刚,等.超声波空化效应对体外培养细胞细胞膜作用的实验研究[J].中华超声影像学杂志,2003,12(8):499-501.

[8] 凌智瑜,王志刚,冉海涛,等.超声微泡造影剂对心肌组织毛细血管通透性的影响实验研究[J].中国超声医学杂志,2004,20(5):327-330.

[9] 方杭君,蔡美明.脂溶性花粉提取物中植物类固醇类物质的含量测定[J].中国生化药物杂志,1999,20(5):304-305.

[10] 蔡美明,方杭君.比色法测定舍尼通片中植物甾醇类物质的含量[J].江苏药学与临床研究,2002,10(1):18-20.

[11] Lindner J R, Coggins M P, Kaul S. Microbubble persistence in the microcirculation during ischemia/reperfusion and inflammations caused by integrin and complement mediated adherence to activated leukocytes[J]. Circulation, 2000, 101(6):668-675.

(责任编辑:关蕴良)