



· 综述 ·

多位点微透析技术在药代动力学研究中的应用

吴兆恩, 王丹巧*

(中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 微透析(MD)作为一种活体生物取样技术,可以在不同组织、不同器官或同一器官不同部位进行化学取样,为阐明药物的体内过程、作用机制以及靶向性提供依据。本文介绍近年来有关多位点微透析技术在药代动力学研究领域中的应用现状和重大进展。

[关键词] 多位点微透析;药代动力学

微透析技术是应用透析原理在动物麻醉或清醒自由活动状态下,对特定部位细胞间隙中小分子化学物质进行活体取样和靶器官直接给药的新手段。微透析取样系统主要由动物清醒活动装置、微量注射泵、微透析探针、收集器、连接管及配套设备组成。通过微量注射泵及其连接管路,以恒定的速度向探针内灌注与组织间液成分近似的等渗溶液(如人工脑脊液、林格液、生理盐水等),当灌流液经过植入体内的探针半透膜时,膜两边的物质顺浓度梯度扩散、进行交换,收集器以一定时间间隔有序收集透析液。结合应用高灵敏度的化学物质检测技术,对收集的微透析样本进行分析检测,以达到连续监测该部位特定化学物质动态变化的目的。1972年就已出现将一支探针置于恒河猴脑部动态取样,观察脑内神经递质多巴胺释放的实验^[1];也有报道通过微透析探针在清醒自由活动状态的帕金森病模型大鼠纹状体内直接给予精确定量的左旋多巴,连续捕捉药物入脑后细胞外液神经生化信息的实验^[2-3]。微透析作为一种新的特色技术已经引起了研究者的注意。

随着微透析技术应用增多、新型探针不断出现、操作技术日趋成熟,最初的脑内单位点微透析技术发展至多位点,应用范围也从脑科学逐渐扩展至心、肺、肝、胆、肾、眼、皮肤、骨骼肌、脂肪、血液等器官和组织的生理、病理、药理及临床研究等各个领域。而高效液相、液相-质谱等高灵敏度化学物质检测技术的进步,也大大的促进了基于微透析采样技术的各项研究,特别是药代动力学研究。传统的药代动力学研究多是采用血液或组织匀浆进行的,而微透析技术的应用,使活

体状态下连续观察血液和机体特定部位的游离药物浓度变化成为可能,进而更真实地反应药物在机体吸收、分布、代谢、排泄的过程。本文对近年来多位点微透析技术在药代动力学研究中的应用作一综述。

1 基于脑、血双位点微透析技术的研究

脑内药代动力学研究对于了解中枢神经系统药物的药理作用及机制是非常重要的,由于血脑屏障(BBB)的存在,很多药物进出脑部的转运过程都受到影响,脑内的药物浓度和血液中的药物浓度不完全一致。而脑部微透析取样技术能够检测到脑内特定部位细胞外液的游离药物浓度,与血液药物浓度结合,能够更客观地判断药物通过血脑屏障的速率和程度、药物在脑内的分布和清除状况等,这是以往采用血液和脑组织匀浆药物浓度推测脑内药代动力学的研究所不能比拟的。柔性探针的出现,使得血液微透析成为可能。该取样方法可以动态观察清醒、自由活动动物血液中游离药物的浓度,与传统的取血方式相比,避免了多次取血所造成的血容量减少、操作过程对动物的干扰,并且收集的透析液样品相对纯净,可以直接用于进样分析,免去了采血分析时一系列繁琐的前处理操作,为药代动力学研究提供了更加有利的手段。脑、血双位点微透析实现了对清醒自由活动或麻醉动物血液和脑部的同步取样,能够同时观测血中和脑中药物浓度的动态变化,可以客观地反映药物在脑内的分布和清除状况,并避免因动物个体差异所造成的实验误差。

1.1 研究血脑屏障对药物通过及其速率的影响 羟考酮是阿片类受体激动剂,主要用于中重度疼痛的治疗,有研究表明在治疗疼痛方面有着与吗啡相似的作用^[4],但与吗啡相比,它与阿片类受体的亲和力比较低。Emma Boström^[5]等利用微透析技术研究了羟考酮的作用机制。微透析探针埋植在SD大鼠的纹状体和颈静脉,分别观察羟考酮在脑内和血液中的分布情况,结果显示羟考酮的浓度在血液、脑中都能很快达到平衡,并且脑中的药物浓度是血液中的3倍;而当羟考酮和吗啡在血中浓度相等时,脑中的浓度前者是后者的

[稿件编号] 20100224002

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772780);中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ2006037)

[通信作者] *王丹巧, Tel: (010) 64014411-3335, E-mail: dqwang96@sohu.com



6 倍^[6]。提示羟考酮通过血脑屏障是一个主动扩散过程,血脑屏障在药物传递过程中起着重要作用。Huang H^[7]等运用相同的方法研究了血脑屏障对中药有效成分黄芩苷通过率的影响,结果显示 SD 大鼠尾静脉注射黄芩苷 24 mg · kg⁻¹ 30 min 后,脑脊液的透析液中被检测到质量浓度是 344 μg · L⁻¹,血液中为 1 250 μg · L⁻¹。说明黄芩苷能够较快通过血脑屏障。

1.2 研究药物在脑内不同区域的分布状况 抗肿瘤药的疗效与肿瘤组织中的药物浓度关系密切。由于肿瘤组织的微环境和正常组织存在很大差异,多数情况下,肿瘤组织中的药物浓度与血药浓度并不一致,血药浓度往往很难真实、客观地反映和评价药物的抗肿瘤效果。Apparaju S K 等^[8]在雄性 SD 大鼠左侧纹状体植入 C6 神经胶质瘤细胞作为肿瘤区,右侧纹状体作为非肿瘤区,分别植入探针考察肿瘤区和非肿瘤区细胞外液吉西他滨的浓度。C6 神经胶质瘤大鼠在静脉注射 25 mg · kg⁻¹ 的吉西他滨之后,在非肿瘤区和肿瘤区的 AUC 值分别为(4.52 ± 2.4), (9.82 ± 3.3) mg · h⁻¹ · mL⁻¹,肿瘤区细胞外液的 AUC 值大约是非肿瘤区的 2.2 倍,肿瘤区药物浓度的高水平促进了吉西他滨对脑肿瘤细胞选择性的治疗作用。

部分中枢神经系统药物在大脑中的分布同样具有选择性,Tong X^[9]等观察了氨基烯酸在脑部不同部位的分布情况。氨基烯酸通过腹腔给药,微透析探针埋植在大鼠的大脑前额皮质和海马中收集细胞外液的样品,颈静脉埋植导管取血,高效液相色谱检测血液和脑中氨基烯酸的药物浓度。结果,氨基烯酸在血液中的浓度呈现剂量依赖性,且能够很快穿过血脑屏障到达前额皮质和海马区。当给药剂量为 500 mg · kg⁻¹ 时,氨基烯酸在前额皮质和海马中的最大浓度分别为 22.5, 12.7 μmol · L⁻¹,前者大约是后者的 2 倍;当给药剂量为 1 g · kg⁻¹ 时,仍然显示出同样的倍数关系。说明氨基烯酸在脑中的分布有区域选择性,前额皮质区明显高于海马区。

2 基于皮肤、关节、血液微透析技术的研究

皮肤是人体最大且最易受外界因素影响的器官,已证实可作为局部和全身给药部位^[10]。经皮给药可维持恒定的有效血药浓度,避免口服给药等引起的血药浓度峰谷现象,降低毒副作用。微透析技术在研究药物的皮肤吸收,分布方面有着独特的优势。Shinkai N^[11]等运用皮肤微透析技术考察了酮洛芬在口服和局部皮肤给药后,药物的吸收、分布差异。微透析探针埋植在膝关节炎模型大鼠的背部皮肤和左侧膝关节,通过颈动脉采血得到血浆样品。结果显示,口服酮洛芬之后在皮肤、膝关节、血中的最大药物浓度 C_{max} 分别为(20.1 ± 5), (4.4 ± 0.4), (5 250.7 ± 1 593) μg · L⁻¹;皮肤局部给药之后,皮肤、膝关节、血中的最大药物浓度 C_{max} 分别为(297.5 ± 478), (2.7 ± 0.9), (65.3 ± 37) μg · L⁻¹。虽然膝关节内药物浓度经皮给药不及口服给药,但是观察其对药效

学指标前列腺素 2(PGE2) 的抑制作用,经皮和口服给药无显著性差异。考虑到经皮给药后血药浓度相对稳定,避免了药物“峰谷现象”对周围组织的毒副作用,因此,酮洛芬皮肤给药优于口服给药。Mathy F X^[12]等运用微透析技术研究了抗真菌药物氟康唑在皮肤和血液中游离药物浓度的相互联系。探针分别埋植在大鼠的背部皮肤和右侧的颈静脉,左侧颈静脉和股静脉埋植导管,分别用来给药和采血。结果显示氟康唑(10 mg · kg⁻¹)通过静脉给药之后能够迅速渗透到真皮,真皮和血浆的药物分配系数为(1.02 ± 0.04),血液和真皮的游离药物浓度-时间曲线非常相似。这对于考察药物在血液和皮肤中的分布、研究药物作用于皮肤的疗效和机制是非常重要的。

3 基于血液、胆汁微透析技术的研究

胆是药物排泄的重要器官,在肝胆小管的上皮细胞有 p-糖蛋白的表达,它对于药物的排泄起着非常重要的作用。Wu Q^[13]将微透析探针埋植在大鼠的颈静脉和胆管进行取样,高效液相色谱进行分析,结果显示在给药后 15 min,玄参苷在胆汁中即达到峰值(533.83 ± 110.38) mg · L⁻¹,并且药物在胆汁和血液中的分配系数为(986.28 ± 78.46);在联合使用 p-糖蛋白抑制剂环孢菌素 A 之后,这个分配系数明显降到(6.41 ± 0.56)。提示玄参苷在胆汁中集中消除,这个过程受 p-糖蛋白调节。

Huang S P^[14]等研究南五味子酮在血液和胆汁的分布情况,微透析探针埋植在 SD 大鼠的颈静脉和胆管,南五味子酮静脉注射给药后 15 min,在血液中的药物浓度达到最大值 1.5 mg · L⁻¹,给药后 30 min,在胆汁的药物浓度达到最大值 0.5 mg · L⁻¹;联合使用环孢菌素 A,南五味子酮在血液中的半衰期由 27 min 增加到 57 min,在胆汁中的半衰期由 84 min 增加到 148 min。说明环孢菌素 A 能够延长南五味子酮在血液中的浓度。利用微透析技术研究药物在血液和胆汁中的分布以及和 p-糖蛋白的关系,对于了解药物的肝胆排泄机制有非常重要的意义,为临床联合应用转运蛋白抑制剂以增加血药浓度、增强疗效提供实验依据。

4 基于三联或四联探针技术的药代动力学研究

肝胆是药物代谢和排泄的主要器官,同时研究血、肝脏、胆汁中药物的浓度变化,能够更好地了解药物吸收、代谢及排泄的特点,揭示三者的内在联系。Tsai P^[15]等把微透析探针埋植在 SD 大鼠的颈静脉、肝脏中叶和胆管,小檗碱(10 mg · kg⁻¹)从股静脉注射给药,观察其药代动力学变化。结果,小檗碱在血、肝脏、胆管中的半衰期分别为(12.5 ± 1.6), (29.4 ± 5.7), (160.0 ± 16.5) min。胆血分配系数为 7.2。给药之后 20 min,肝脏和胆汁中的药物浓度达到最高,分别为 0.34, 19.21 g · L⁻¹,血液中的药物浓度在给药后 10 min 时达到峰值为 1.81 g · L⁻¹,并且在整个实验过程中小檗碱在胆汁中的浓度都明显高于血中的浓度。提示小檗碱的肝胆排泄是逆浓度差的主动转运。



Lin L C^[16] 等把微透析探针植入 SD 大鼠的颈静脉、纹状体、胆管中,进行天麻素的体内药代动力学研究。天麻素高低剂量组(300,100 mg · kg⁻¹)经静脉给药,20 min 后,在纹状体达到峰值浓度,分别为 5.2,1.4 mg · L⁻¹,血脑分配比率分别为(0.01 ± 0.002), (0.007 ± 0.003)。在给药后 15 min,天麻素在胆汁中的浓度达到峰值,为 37.1 mg · L⁻¹。随后对天麻素及其代谢产物对羟基苯甲醇(HBA)的深入研究^[17]显示,天麻素静脉注射以后不仅很快分布到肝脏和脑纹状体中,并且很快转换成 HBA,给药后 15 min,HBA 在脑中达到 77.7 μg · L⁻¹。在肝脏达到 34.7 μg · L⁻¹。

据报道,目前微透析技术已经发展到四联探针技术,即在麻醉动物体内同时插入四根探针,根据实验需要监测 4 种不同组织或同一组织 4 个不同部位的药物代谢动力学变化^[18]。

5 小结

综上所述,基于多位点微透析技术的药代动力学研究方法是可行的,是脑内单位点微透析技术的发展。其优势在于:①同时观察同一动物的血液及靶器官药物浓度及其经时变化,所提供数据的意义有别于传统方法(清醒自由活动状态下采样,对动物的干扰和刺激微小;各时点药物浓度之间具有移行性和连续性,有助于准确分析药物在体内吸收、分布的过程)。②同时提供血液、肝脏、肾脏、胆汁中药物浓度及其经时变化的数据,有助于准确分析药物在体内代谢、排泄的过程。③数据反映的是靶部位细胞外液的药物浓度,与传统的组织匀浆检测方法比较,在探讨药物受体定位、配体亲和力强度、药物对递质、激素释放与再摄取的影响等机制方面更具说服力。④大大减少了实验所需的动物数量及个体差异带来的影响。⑤微透析探针半透膜截留了蛋白质等生物大分子物质,不仅使透析液样本避免了酶解作用,还可以直接进入高效液相色谱或毛细管电泳等生化分析。

由于微透析采样是一个经时过程,达不到神经电生理检测那样高的瞬时分辨率;目前的微透析探针最大截留分子量为 10 万道尔顿,样品中的目标检测物受到探针孔径的限制,生物大分子无法进行透析并动态观察;设备及其耗材价格昂贵等,是微透析技术存在的局限性。至于微透析探针的植入可能造成组织损伤^[19]、血脑屏障的破坏^[20]、细菌感染^[21]等,可以通过操作及其他技术控制或减少发生机率,不会影响实验进行。可以预见,微透析作为一种新型的采样技术,特别是多位点微透析-高灵敏度化学检测技术的发展,将在阐明药物吸收、分布、代谢、排泄等体内过程、靶向性等方面发挥重要作用,特别是在中医药整体-动态、药动-药效相结合的研究方面有着不可替代的优势和广阔的应用前景。

[参考文献]

[1] Delgado J M, Defeudis F V, Roth R H, et al. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys [J]. Arch Int Pharmacody Ther, 1972, 198(1): 9.

[2] 王丹巧,王巍,景富春,等. 川芎嗪对左旋多巴处理的 PD 大鼠纹状体细胞外液 DA 及其代谢产物、羟自由基水平的影响[J]. 中国药理学杂志,2007,42(1):28.

[3] 王丹巧,王巍,景富春,等. 川芎嗪对帕金森病大鼠脑内灌注左旋多巴引起的脑氧化损伤的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2007,27(7):629.

[4] Silvasti M, Rosenberg P, Seppala T, et al. Comparison of analgesic efficacy of oxycodone and morphine in postoperative intravenous patient-controlled analgesia[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 1998, 42(5):576.

[5] Boström E, Simonsson U S, Hammarlund-Udenaes M. In vivo blood-brain barrier transport of oxycodone in the rat: indications for active influx and implications for pharmacokinetics/pharmacodynamics[J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(9):1624.

[6] Boström E, Hammarlund-Udenaes M, Simonsson U S. Blood-brain barrier transport helps to explain discrepancies in in vivo potency between oxycodone and morphine [J]. Anesthesiology, 2008, 108(3):495.

[7] Huang H, Zhang Y, Yang R, et al. Determination of baicalin in rat cerebrospinal fluid and blood using microdialysis coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 874(1/2):77.

[8] Apparaju S K, Gudelsky G A, Desai P B. Pharmacokinetics of gemcitabine in tumor and non-tumor extracellular fluid of brain: an in vivo assessment in rats employing intracerebral microdialysis [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008, 61(2):223.

[9] Tong X, Ratnaraj N, Patsalos P N. Vigabatrin extracellular pharmacokinetics and concurrent gamma-aminobutyric acid neurotransmitter effects in rat frontal cortex and hippocampus using microdialysis[J]. Epilepsia, 2009, 50(2):174.

[10] Prausnitz M R, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of trans-dermal drug delivery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(2):115.

[11] Shinkai N, Korenaga K, Mizu H, et al. Intra-articular penetration of ketoprofen and analgesic effects after topical patch application in rats[J]. J Control Release, 2008, 131(2):107.

[12] Mathy F X, Ntivunwa D, Verbeeck R K, et al. Fluconazole distribution in rat dermis following intravenous and topical application: a microdialysis study[J]. J Pharm Sci, 2005, 94(4):770.

[13] Wu Q, Wen X D, Qi L W, et al. An in vivo microdialysis measurement of harpagoside in rat blood and bile for predicting hepatobiliary excretion and its interaction with cyclosporin A and verapamil [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877(8/9):751.

[14] Huang S P, Lin L C, Wu Y T, et al. Pharmacokinetics of kadarenone and its interaction with cyclosporin A in rats using a combined HPLC and microdialysis system [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877(3):247.

[15] Tsai P, Tsai T H. Simultaneous determination of berberine in rat



- blood, liver and bile using microdialysis coupled to high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 961(1): 125.
- [16] Lin L C, Chen Y F, Tsai T R, et al. Analysis of brain distribution and biliary excretion of a nutrient supplement, gastrodin, in rat[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 590(2):173.
- [17] Lin L C, Chen Y F, Lee W C, et al. Pharmacokinetics of gastrodin and its metabolite *p*-hydroxybenzyl alcohol in rat blood, brain and bile by microdialysis coupled to LC-MS/MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3):909.
- [18] Woo K L, Lunte C E. The direct comparison of health and ulcerated stomach tissue; a multiple probe microdialysis sampling approach[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(1):85.
- [19] Ault J M, Riley C M, Meltzer N M, et al. Dermal microdialysis sampling *in vivo*[J]. *Pharm Res*, 1994, 11(11):1631.
- [20] Groothuis D R, Ward S, Schlageter K E, et al. Changes in blood-brain barrier permeability associated with insertion of brain cannulas and microdialysis probes[J]. *Brain Res*, 1998, 803(1/2):218.
- [21] Huff J K, Bresnahan J F, Davies M I. Preliminary evaluation of several disinfection/sterilization techniques for use with microdialysis probes[J]. *Life Sci*, 2003, 73(3):275.

Application of sites-microdialysis technology in pharmacokinetic studies

WU Zhaoen, WANG Danqiao*

(*Experimental Research Centre, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China*)

[**Abstract**] Microdialysis (MD), as a living bio-sampling technique, can be utilizable in different tissues, organs or different parts of the same organs, in order to clarify the drug's pharmacokinetics, mechanism, and provide a basis for targeting. This article describes a number of points in recent years, the microdialysis technique in pharmacokinetic studies in the field of application of the status and significant progress.

[**Key words**] sites-microdialysis; pharmacokinetic

doi: 10.4268/cjcm20101324

[责任编辑 张宁宁]