

比格犬体内环磷酰胺对白消安药动学及血清 GST 活性的影响

杨青山, 尚晓庆, 段丹昱, 张丽锋^{*}(山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要: 目的 研究比格犬体内环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)对白消安(busulfan, Bu)的药动学及谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase, GST)活性影响。方法 取3只比格犬进行双周期交叉试验, 设置分组为对照组(单独静脉注射 Bu 0.898 mg·kg⁻¹)和实验组(先连续4 d口服 Cy 14.960 mg·kg⁻¹, 然后静脉注射 Bu 0.898 mg·kg⁻¹), 分别在0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 h于犬前肢静脉取血2 mL, 分离血清, 利用高效液相色谱法测定 Bu 浓度, 采用非隔室模型计算药动学参数。利用紫外分光光度法测定并比较对照组和实验组的 GST 活性。结果 与对照组相比, 实验组 Bu 的 MRT 减少了25.2%, AUC_{0-t}减少了44.5%, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。GST 活性测定结果表明, 实验组各时间点的 GST 活性比对照组均有提高。结论 预先给予 Cy 后, GST 活性提高, 加快 Bu 消除, 降低其血药浓度总体水平。

关键词: 环磷酰胺; 白消安; 药动学; 谷胱甘肽巯基转移酶; 高效液相色谱法

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)19-2528-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.19.014

引用本文: 杨青山, 尚晓庆, 段丹昱, 等. 比格犬体内环磷酰胺对白消安药动学及血清 GST 活性的影响[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(19): 2528-2532.

Effect of Cyclophosphamide on Busulfan Pharmacokinetics and Serum GST Activity in Beagle Dogs

YANG Qingshan, SHANG Xiaoqing, DUAN Danyu, ZHANG Lifeng^{*}(School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of cyclophosphamide(Cy) on busulfan(Bu) pharmacokinetics and glutathione S-transferase(GST) activity. **METHODS** Three beagle dogs were taken for a two-cycle crossover test, and the groups were divided into the control group and the experimental group. The control group was injected Bu alone(0.898 mg·kg⁻¹). The experimental group was oral Cy(14.960 mg·kg⁻¹) for 4 consecutive days, firstly, and then injected Bu(0.898 mg·kg⁻¹). The 2 mL of blood samples were collected from the forelimb veins of dogs at 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 h. The Bu concentration was determined by HPLC, and the pharmacokinetic parameters were calculated using a non-compartment model. The GST activity of the control group and the experimental group was measured by UV spectrophotometry and compared. **RESULTS** Compared with the control group, the MRT and AUC_{0-t} of Bu in the experimental group decreased by 25.2% and 44.5%, respectively. There was a statistically significant difference ($P<0.05$). The results of GST activity showed that the GST activity in the experimental group was higher than that of the control group at each time points. **CONCLUSION** GST activity increased after pre-administration of Cy, Bu elimination accelerated, and the overall level of blood concentration decreased.

KEYWORDS: cyclophosphamide; busulfan; pharmacokinetics; glutathione S-transferase; HPLC

造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)是治疗急慢性白血病、多发性骨髓瘤等恶性血液病的有效治疗手段, 患者进行 HSCT 前需要进行预处理, 目的是清除患者体内的原始造血细胞、肿瘤细胞, 抑制其体内免疫细胞的功能, 减少移植物抗宿主病的发生^[1]。其中白消安(busulfan, Bu)联合环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)是 HSCT 预处理的经典方案^[2-3]。

Bu 是一种双甲基磺酸酯类烷化剂, 体内代谢过程为在谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione

S-transferase, GST)的催化下, 和谷胱甘肽(glutathione, GSH)发生结合反应生成白消安-S 谷胱甘肽共轭物(Bu-SG), 最终代谢为 *N*-(*N*-L-γ-谷氨酰基-L-半胱氨酰基)甘氨酸-2-硫化物(GSG)排出体外^[4]。Cy 是一种前药, 在体内主要经细胞色素 P450(CYP450)代谢, 其氮芥中间代谢产物会对 GST 产生修饰性激活^[5]。因此当联用 Bu 和 Cy 时, Cy 可能会对 Bu 的药动学产生影响, 而 Bu 的疗效和不良反应与其药动学密切相关, 过低的系统暴露量会增加移植排斥反应和疾病复发的几率, 而

基金项目: 山西省自然科学基金项目(201901D111208)

作者简介: 杨青山, 男, 硕士生

E-mail: 541578603@qq.com

^{*}通信作者: 张丽锋, 男, 博士, 副教授

E-mail: zhanglf7@126.com

过高则会导致肝肺肾毒性^[6-8]。目前国内外对于 Cy 对 Bu 的药动学影响的研究较少^[9], 考虑到比格犬对药物耐受性好, 笔者根据实验室前期建立的家兔体内 Bu 测定方法^[10], 对 Bu 在比格犬体内测定方法进行方法学验证, 并对比格犬体内 Cy 对 Bu 的药动学及血清中 GST 活性的影响进行研究, 为临床合理用药提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

L-2000 高效液相色谱仪(日本日立公司); L5S 紫外可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); TDZ5-WS 台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); DV215CD 天平(奥豪斯国际贸易上海有限公司); CT15E 高速冷冻离心机(日本日立公司); NDK200 氮气吹扫仪(杭州米欧仪器有限公司); LaboStar 2 DI 超纯水机(西门子股份公司)。

1.2 药物与试剂

Bu(Aladdin, 批号: L1305060; 纯度 $\geq 98\%$); 内标(IS)为 1,5-戊二醇二甲基磺酸酯(杭州麦俊化工科技有限公司, 批号: 2374223; 纯度 $\geq 98\%$); 二乙基二硫代氨基甲酸钠(sodium diethyldithiocarbamate, DDTC, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: Z29S7Y22163; 纯度: 99%); 注射用 Cy 环磷酰胺粉针剂(江苏盛迪医药有限公司, 批号: H32020857; 规格: 每支 0.2 g); GST 活性检测试剂盒(内含试剂二 CDNB 溶液和试剂三 GSH 粉末, 苏州科铭生物技术有限公司, 批号: 20191010); 甲醇(色谱纯, 天津星马克科技发展有限公司); 乙腈(色谱纯, 天津市科盟化工工贸有限公司); 水为超纯水。

1.3 动物

成年健康比格犬 3 只, 体质量(12 ± 2)kg, 北京芳元缘养殖场提供, 生产许可证号: SCXK(京)2014-0012。所有操作均符合动物伦理学要求。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[10]

色谱柱: Diamonsil(II) C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流动相: 甲醇-水(54 : 46); 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长: 280 nm; 进样量: 25 μ L。

2.2 溶剂的配制^[10]

精密称定 5.0 mg Bu 于 100 mL 量瓶中, 乙腈溶解并定容, 得到浓度为 50.0 mg $\cdot$ L⁻¹ 的标准储备

液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 临用前取适量配制浓度为 0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0, 14.0 mg $\cdot$ L⁻¹ 的 Bu 系列对照品溶液。

精密称定 4.0 mg 1,5-戊二醇二甲基磺酸酯于 100 mL 量瓶中, 乙腈溶解并定容, 制得浓度为 40.0 mg $\cdot$ L⁻¹ 的 IS 对照品储备液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 临用前乙腈稀释成 4.0 mg $\cdot$ L⁻¹ 的 IS 对照品溶液。

称取 0.4 g DDTC, 超纯水溶解, 得到饱和浓度的 DDTC 溶液, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

取比格犬空白血清和 Bu 对照品溶液, 分别配制成浓度为 0.2, 1.0, 2.5 mg $\cdot$ L⁻¹ 的质控样品。

2.3 生物样品的制备

取含药血清 200 μ L, 内标 50 μ L, 加入 500 μ L 乙腈去蛋白, 加入新鲜配制的 100 μ L DDTC 溶液, 30 $^{\circ}$ C 衍生化 30 min, 400 μ L 冰水终止反应, 加入 3 mL 乙醚萃取, 2 810 $\times$ g 离心 10 min, 取上层于 30 $^{\circ}$ C 下氮吹, 200 μ L 甲醇复溶, 13 760 $\times$ g 离心 10 min, 吸取 25 μ L 进样分析。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 设 4 个组: 分别取空白血清 200 μ L+50 μ L 乙腈、空白血清 200 μ L+IS 对照品溶液 50 μ L、空白血清 150 μ L+Bu 4 mg $\cdot$ L⁻¹对照品溶液 50 μ L+IS 对照品溶液 50 μ L、Beagle 犬对照组给药后 1 h 血清样品 200 μ L+IS 对照品溶液 50 μ L, 按“2.3”项下方法处理, 进样分析, 结果见图 1。Bu 的保留时间为 10.2 min, IS 的保留时间为 16.1 min, 均不受样品内源性物质的干扰。

2.4.2 标准曲线的制备 取比格犬空白血清 150 μ L, 分别加入系列 Bu 对照品溶液, 配制成浓度为 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.5 mg $\cdot$ L⁻¹ 的血清样品, 按“2.3”项下方法处理进样分析($n=6$)。以 Bu 浓度为横坐标, Bu 与 IS 的峰面积比值为纵坐标进行线性回归, 得标准曲线 $Y=1.6015X-0.1353$, $R^2=0.9918$, 表明 Bu 在 0.1~3.5 mg $\cdot$ L⁻¹ 内线性关系良好, 定量下限为 0.1 mg $\cdot$ L⁻¹ (RSD=2.81%, $n=6$)。

2.4.3 仪器精密度试验 分别取 3 种浓度的质控样品(0.2, 1.0, 2.5 mg $\cdot$ L⁻¹), 按“2.3”项下方法处理进样分析, 每个浓度平行 6 个样本, 连续测定 3 d, 以随行标准曲线计算 Bu 浓度, 结果见表 1。

2.4.4 萃取回收率 分别取 3 种浓度的质控样品(0.2, 1.0, 2.5 mg $\cdot$ L⁻¹), 每个浓度平行 6 个样本,

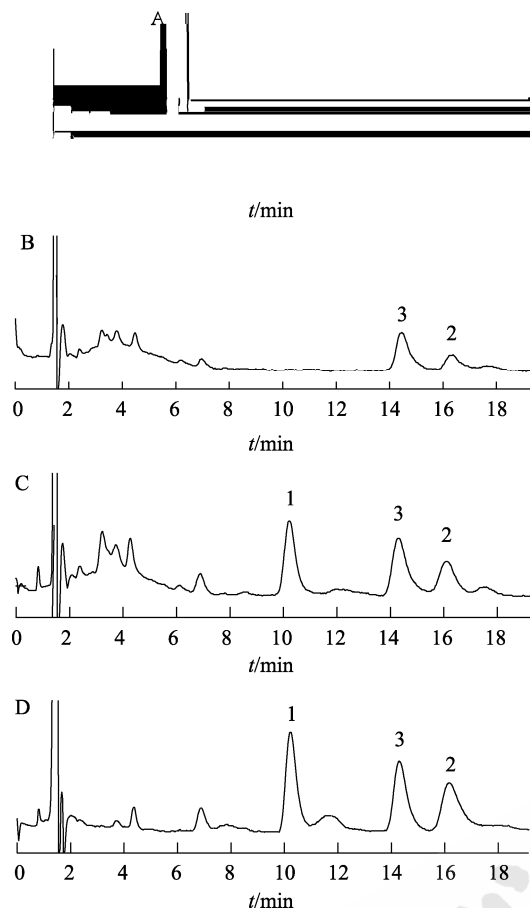


图1 高效液相色谱图

A-空白血清+DDTC; B-空白血清+IS+DDTC; C-空白血清+Bu+IS+DDTC; D-血清样品+IS+DDTC; 1-Bu; 2-IS; 3-DDTC。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank serum+DDTC; B-blank serum+IS+DDTC; C-blank serum+Bu+IS+DDTC; D-serum sample+IS+DDTC; 1-Bu; 2-IS; 3-DDTC.

表1 准确度和精密度结果($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 1 Results of accuracy and precision ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	日内精密性			日间精密性		
	测定浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	RE/%	测定浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	RE/%
0.2	0.198 ± 0.006	2.77	1.01	0.207 ± 0.009	4.25	3.38
1.0	1.037 ± 0.087	8.36	3.57	1.095 ± 0.050	4.61	8.68
2.5	2.505 ± 0.082	3.29	0.20	2.488 ± 0.034	1.36	0.48

按“2.3”项下方法处理进样分析,以同体积超纯水代替空白血清制备样品进样分析,二者Bu的峰面积比值即为萃取回收率,分别为91.6%,100.9%,102.1%($n=6$)。

2.4.5 稳定性试验 分别取3种浓度的质控样品(0.2, 1.0, 2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),每个浓度平行6个样本,考察反复冻融、短期室温(24 h)、长期冻存的稳定性(-20°C , 30 d)。结果表明, Bu 短期室温稳定性RSD分别为11.58%, 6.67%, 8.09%;长期冻存稳定性RSD分别为2.77%, 8.36%, 3.29%;3次冻-

融稳定性RSD分别为10.08%, 11.83%, 6.40%。

2.5 统计学分析

数据经统计软件SPSS 22.0处理,统计方法为配对 t 检验法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.6 药动学研究

成年健康比格犬3只,进行双周期交叉试验。第1周期犬1为对照组给药,犬2~3为实验组给药,待药物洗净后,第2周期犬1为实验组给药,犬2~3为对照组给药。对照组给药方案为单独静脉注射Bu,实验组给药方案为每天1次Cy口服给药,连续4d,第4天Cy给药1h后静脉注射Bu。Bu静脉注射剂量和Cy口服剂量分别为 $0.898 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $14.960 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。给药前禁食12 h,自由饮水。所有组别给药后于0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 h于犬前肢内侧静脉取血2 mL,于 37°C 水浴中放置30 min析出血清,2810×g离心10 min,分离得血清,按“2.3”项下方法处理进样分析,绘制药-时曲线,见图2。实验组3h之后的Bu浓度低于定量限,对照组6h之后的Bu浓度低于定量限。

采用非隔室模型,经药动学软件DAS 3.2计算药动学参数,结果显示,与对照组比较,实验组的AUC、MRT均显著低于对照组($P<0.05$),表明实验组中Bu的代谢速度比对照组更快。结果见表2。

表2 对照组与实验组中Bu的药动学参数($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Pharmacokinetic parameters of Bu in control group and experimental group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

参数	对照组	实验组
$\text{AUC}_{0-t}/\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	3.37 ± 0.18	$1.87 \pm 0.07^{(1)}$
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	4.09 ± 0.53	$2.28 \pm 0.29^{(1)}$
$\text{AUMC}/\text{mg} \cdot \text{h}^2 \cdot \text{L}^{-1}$	4.41 ± 0.28	$1.84 \pm 0.05^{(1)}$
MRT/h	1.31 ± 0.07	$0.98 \pm 0.05^{(1)}$
$\text{CL}/\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.22 ± 0.03	$0.40 \pm 0.05^{(1)}$

注:与对照组比较, $^{(1)}P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, $^{(1)}P<0.05$.

2.7 血清GST活性变化

吸取20 μL 含药血清,先后加入20 μL 试剂三(GSH溶液,临用前加超纯水配制, 37°C 水浴保温)和180 μL 试剂二(CDNB溶液),迅速混匀后测定340 nm处吸光度,于40 s和340 s时记录吸光度 A_1 和 A_2 ,按下列公式计算:

$$\text{GST}/\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{(A_2 - A_1) \times V_{\text{反应}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times t}$$

$$= 230 \times (A_2 - A_1)$$

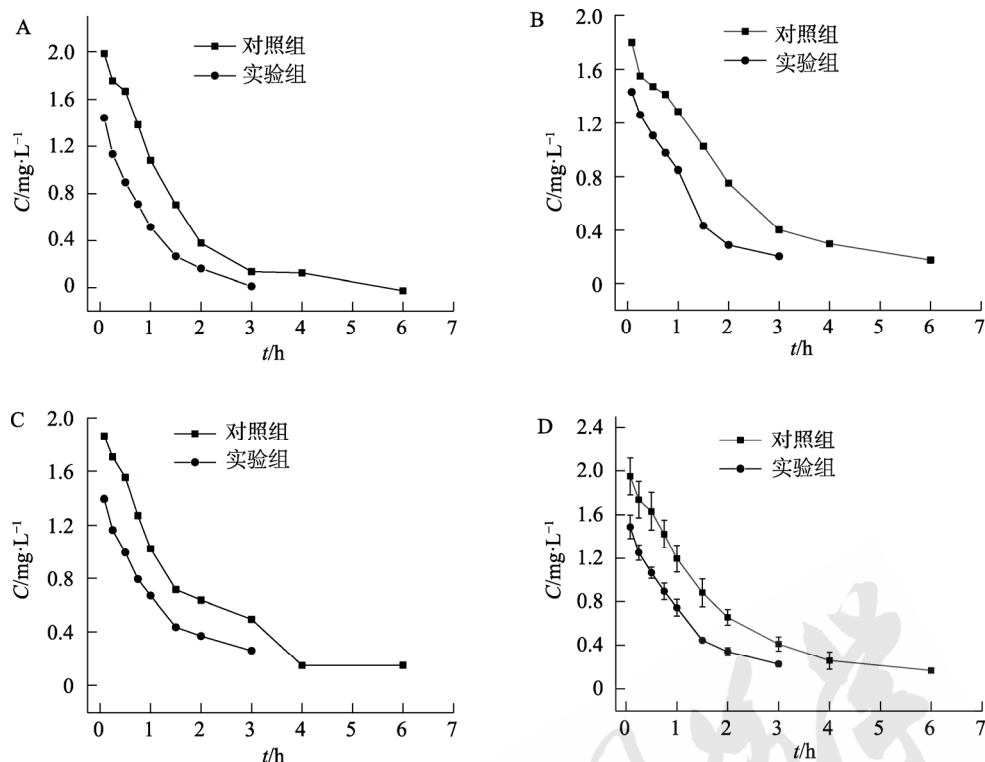


图2 对照组与实验组中 Bu 的药-时曲线($n=3$)

A-犬 1 的药-时曲线; B-犬 2 的药-时曲线; C-犬 3 的药-时曲线; D-平均药-时曲线。

Fig. 2 Serum concentration-time curve of Bu in control group and experimental group($n=3$)

A-serum concentration-time curve of dog 1; B-serum concentration-time curve of dog 2; C-serum concentration-time curve of dog 3; D-mean serum concentration-time curve.

公式中, $V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, 220 μL ; $V_{\text{样}}$: 加入体系的血清体积, 20 μL ; ϵ : 产物的摩尔吸光系数, $9.6 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; d : 比色皿光径, 1 cm; t : 反应时间, 5 min。

测定对照组和实验组在各时间点(未给药时、Cy 给药 1 h、Bu 给药 0.083 h、Bu 给药 1 h)的样品 GST 活性, 结果显示在对照组中, Bu 给药后的 GST 活性相比未给药时均无显著变化, 表明 Bu 对 GST 活性无明显作用。结果见表 3。

表3 对照组和实验组各时间点 GST 活性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 3 GST activity of control group and experimental group at different time points($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

时间	GST 活性/ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	对照组	实验组
未给药时	3.87 ± 0.76	4.16 ± 0.92
Cy 给药 1 h	—	$7.31 \pm 0.61^{1)}$
Bu 给药 0.083 h	3.94 ± 0.53	$6.35 \pm 0.87^{2)}$
Bu 给药 1 h	3.96 ± 0.70	5.21 ± 0.11

注: 与实验组未给药时比较, $^{1)}P<0.05$; 与对照组 Bu 给药 0.083 h 比较, $^{2)}P<0.05$ 。

Note: Compared with non-administration in experimental group, $^{1)}P<0.05$; compared with 0.083 h after Bu administration in control group, $^{2)}P<0.05$ 。

在实验组中, 与未给药时相比, 给予 Cy 后 GST 活性均有增加, 且在 Cy 给药 1 h 时显著增加

($P<0.05$), 表明 Cy 对 GST 活性存在诱导作用, 并表现出一定的时间关系, 在 Cy 给药 1 h 时 GST 活性最高, 此后逐渐降低; 实验组与对照组比较, 在 Bu 给药 0.083 h 时, 实验组 GST 活性显著增大($P<0.05$), 在 Bu 给药 1 h 时, 实验组和对照组 GST 活性差异无统计学意义。

3 讨论

实验室前期建立了一种柱前衍生化法测定家兔体内 Bu 含量^[10], 考虑到种属差异, 本实验对该方法在比格犬体内进行了方法学验证, 结果表明该方法可用于探究比格犬体内 Bu 浓度随时间变化的关系。

实验室前期对家兔体内 Bu 和 Cy 的药动力学进行研究^[11], 结果显示实验组中 Bu 半衰期变短, 清除率却降低, 并且 AUC 无显著变化。本实验结果显示, 实验组中, Bu 在体内的 AUC、MRT 均显著减小, 清除率显著增加。推测原因可能是动物种属差异, 家兔的胃肠道对于有刺激性的药物反应敏感^[12], 而 Cy 正是一种口服刺激性药物, 可能会对结果产生影响。GST 活性测定结果显示, Bu 对比格犬体内 GST 活性无明显诱导作用, 而 Cy

可以诱导 GST 活性,并存在一定的时间关系,GST 活性在 Cy 给药 1 h 时达到峰值,此后开始降低,与文献报道在小鼠体内的结果相似^[5,13],并且实验组的 GST 活性比对照组显著提高,表明 Cy 可能通过诱导 GST 活性,从而加快 Bu 代谢,继而可能影响 Bu 的疗效和不良反应。当然本研究动物数量较少,有一定的局限性。

REFERENCES

- [1] 彭倩雯, 陈冰, 杨婉花. 白消安在造血干细胞移植中的应用及治疗药物监测进展[J]. 中国药房, 2013, 24(10): 944-947.
- [2] SUN W, WANG X H, BAI J. The curative effect of the modified BU/CY preconditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of refractory and relapsed malignant hematologic disease[J]. China Continuing Med Educ(中国继续医学教育), 2016, 8(11): 118-119.
- [3] LI X L, LUO L Y, HE Y R, et al. Clinical observation of busulfan, cyclophosphamide and etoposide as the conditioning in 22 patients with multiple myeloma treated by autologous hematopoietic stem cell transplantation[J]. J Clin Hematol(临床血液学杂志), 2020, 33(1): 63-67.
- [4] MYERS A L, KAWEDIA J D, CHAMPLIN R E, et al. Clarifying busulfan metabolism and drug interactions to support new therapeutic drug monitoring strategies: A comprehensive review[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017, 13(9): 901-923.
- [5] ZHENG Y, ZOU X H, FU Z L, et al. Activation of mouse liver microsomal glutathione S-transferase I by cyclophosphamide treatment *in vivo*[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2013, 29(10): 1387-1390.
- [6] ZAO J H, SCHECHTER T, LIU W J, et al. Performance of busulfan dosing guidelines for pediatric hematopoietic stem cell transplant conditioning[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2015, 21(8): 1471-1478.
- [7] SU H Z, ZHANG S T, SUN Z M, et al. Limited sampling strategy for primary estimation of the area under the curve of busulfan in HSCT patients[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(10): 1220-1225.
- [8] TEN BRINK M H, ZWAVELING J, SWEN J J, et al. Personalized busulfan and treosulfan conditioning for pediatric stem cell transplantation: The role of pharmacogenetics and pharmacokinetics[J]. Drug Discov Today, 2014, 19(10): 1572-1586.
- [9] SADEGHI B, JANSSON M, HASSAN Z, et al. The effect of administration order of BU and CY on engraftment and toxicity in HSCT mouse model[J]. Bone Marrow Transplant, 2008, 41(10): 895-904.
- [10] LIU Q M, TIAN W W, YU G Y, et al. Determination of pharmacokinetic parameters of busulfan in rabbits by pre-column derivatization HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(9): 1308-1313.
- [11] LIU Q M. Study on the pharmacokinetics and the interaction with cyclophosphamide of busulfan[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2018.
- [12] ZHANG Y H, JIANG J D, KONG W J. Research progress with non-rodent species in reproductive toxicity studies[J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志), 2019(11): 111-115.
- [13] BOULIGAND J, DEROUSSENT A, SIMONNARD N, et al. Induction of glutathione synthesis explains pharmacodynamics of high-dose busulfan in mice and highlights putative mechanisms of drug interaction[J]. Drug Metab Dispos, 2007, 35(2): 306-314.

收稿日期: 2021-08-04
(本文责编: 曹粤锋)