

·实验研究 Experimental research·

新型温敏性栓塞剂用于脑动静脉畸形实验研究

王绍胜, 张文堃, 董 杰

【摘要】 目的 合成一种新型温度敏感性液体栓塞材料并探讨其栓塞脑动静脉畸形(AVM)的可行性。**方法** 应用氮-异丙基丙烯酰胺和氮-正丙基丙烯酰胺合成共聚物,进行物理性质测定和生物学检测并进行体外 AVM 模型栓塞试验。**结果** 共聚物具有低临界溶解温度(LCST),具有水溶性和非黏附性特点,生物相容性好,能成功栓塞体外 AVM 模型。**结论** 该共聚物为一种脑 AVM 血管内栓塞治疗的新型液体栓塞材料,可进一步用于临床实验研究。

【关键词】 温度敏感性; 栓塞剂; 动静脉畸形; 介入性

中图分类号:R743.4 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2010)-06-0471-04

A new-type non-adhesive thermosensitive liquid embolic agent for the embolization of cerebral arteriovenous malformation: an experimental study WANG Shao-sheng, ZHANG Wen-kun, DONG Jie. Department of Radiology, the Affiliated Qianfoshan Hospital of Shandong University, Ji'nan 250014, China Corresponding author: DONG Jie, E-mail: dongjie@sdhospital.com.cn

【Abstract】 Objective To synthesize a new-type thermosensitive liquid embolic material and to investigate the feasibility of using this material to occlude cerebral arteriovenous malformations (AVMs). **Methods** The copolymer was synthesized with N-isopropylacrylamide (NIPAM) and N-n-propylacrylamide (NNPAM), and its physical and biological properties were estimated. The embolization of AVMs model in vitro by using this copolymer was conducted and the results were analyzed. **Results** The new-type copolymer possessed unique thermal behavior of lower critical soluble temperature (LCST), and it was water-soluble and non-adhesive with better biocompatibility. The successful embolization of AVMs model could be reliably obtained. **Conclusion** The copolymer synthesized by the authors is a new-type liquid embolic agent suitable for endovascular embolization of cerebral AVMs in vitro. Based on the results in experiment animals having been reported in medical literature, this copolymer can be further used in clinical research. (J Intervent Radiol, 2010, 19: 471-474)

【Key words】 thermosensitivity; embolic agent; arteriovenous malformation; intervention

应用液体性栓塞材料介入栓塞治疗脑动静脉畸形(AVM)具有栓塞效果稳定,栓塞后血管不容易再通,在 AVM 的介入性血管内治疗中起着十分重要的作用^[1]。目前临床应用最多的介入栓塞材料是氰丙烯酸正丁酯(N-butyl 2-cyanoacrylate, NBCA),由于 NBCA 具有黏附性,容易使导管与血管壁粘连,而且栓塞后病灶难以切除。最近研制开发并应用到临床的非黏附性液体栓塞材料如 Onyx 和醋酸纤维素聚合物(cellulose acetate polymer, CAP),具有不粘管,栓塞后病灶柔软容易切除等特点,但是需要二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)做溶剂,DMSO 有

明显的血管毒性作用,且要求微导管通过较直的血管进入畸形团、足够反流长度、以及拔管困难等局限性,研制新型非黏附性液体栓塞材料仍是必要。

我们研制了氮-异丙基丙烯酰胺和氮-正丙基丙烯酰胺的共聚物水溶胶。该共聚物具有低临界溶解温度(LCST)特性,低于这个温度聚合物为水溶性,达体温时则失去其水溶性而凝聚成固体,起到栓塞作用。分析这种温度敏感性栓塞材料的物理性质,并进行体外模拟实验,探讨其对脑 AVM 进行介入栓塞的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 共聚物的合成 分别称取一定量的氮-异丙

作者单位:250014 济南 山东大学附属千佛山医院影像科

通信作者:董 杰 E-mail: dongjie@sdhospital.com.cn

基丙烯酸酰胺和氮-正丙基丙烯酸酰胺单体,根据两种单体的摩尔比共聚物分别编号为 1、2、3、4、5。两种单体混合,加入 10 ml 蒸馏水,磁力搅拌溶解,通氮气 30 min,加入引发剂四甲基乙二胺(TMEDA)/ Na_2SO_3 和过硫酸钾(KPS),保持低温聚合反应 6 h。反应完毕后将共聚物在热水中沉淀,得到白色共聚物,反复洗涤并将共聚物溶解,在蒸馏水中透析,将未反应的单体及引发剂除去,得到纯的共聚物溶液,将此溶液加热、沉淀、过滤,真空烘干固体。

1.1.2 LCST 测定 配制一定浓度的聚合物,置于恒温水槽中,观察溶液出现沉淀的温度,即为此聚合物的 LCST。

1.1.2.1 相对分子质量测定: 称取一定量的聚合物溶于水中,在 25 ml 容量瓶中定容,用乌氏黏度计在 20℃ 恒温水浴中测定溶液的流出时间。改变溶液的浓度,测定不同聚合物浓度时的溶液黏度,根据方程 $[\eta] = 14.5 \times 10^{-2} M^{0.5} (\text{ml/g})$ 计算其黏均分子量。方程中 $[\eta]$ 为共聚物特性黏度, M 为黏均分子量。

1.1.2.2 沉淀时间测定: 配制一定浓度的聚合物,并加入碘海醇(300 mg/ml)。用 1 ml 注射器接 18 G 针头抽取溶液,距离液面 1 cm 注入 37℃ 生理盐水液面上,秒表测定沉淀时间。

1.1.2.3 生物学检测: 样品送国家食品药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心,进行包括无菌、细胞内毒素、溶血、急性全身毒性、细胞毒性、皮内刺激、皮肤致敏、植入、砷含量、重金属含量、pH 值、单体残余量和黏度 13 项全性能生物检测。

1.2 方法

1.2.1 体外模拟输送模拟试验 为进行栓塞材料的体外模拟输送实验,我们设计制作了如图 1 所示的装置。该装置由长 900 mm、外径 80 mm 的玻璃管和带水泵的恒温水箱组成,恒温水箱为玻璃管提供恒温循环水,使玻璃管内的水温维持在 37℃;8 F 导引导管贯穿玻璃管,微导管通过 Y 型接头穿过导引导管。该装置可以模拟栓塞材料的输送环境,如在 37℃ 条件下的可操作性,以便在临床应用之前确定栓塞材料配方、使用条件、推注速度等。应用 1 ml 注射器注射高温高压灭菌共聚物水溶液,注射前后分别应用冷生理盐水冲洗微导管以防共聚物在微导管中沉淀而堵塞。

1.2.2 体外栓塞效果模拟试验 对文献中体外 AVM 模型稍作改进,按图 2 所示进行实验。玻璃管和为其提供恒温循环水的恒温水箱与图 1 中的相同;将 12 g 直径 2 mm 的玻璃珠装入容积 10 ml 的玻璃

容器中,玻璃容器置于恒温的玻璃管内,通过 PVC 管与生理盐水瓶相联,生理盐水与玻璃柱出口的垂直距离为 150 cm;微导管通过 Y 型接头置于玻璃容器内。将生理盐水(37℃)的流速调节为约 0.3 ml/s,在流出端下方置一盛热水的烧杯。用 1 ml 注射器把待测的高温高压灭菌聚合物溶液通过微导管注入,观察栓塞剂的弥散情况,有无沉淀物经过玻璃珠由出口流出,连续推注共聚物水溶液直到水流停止。通过该实验装置,可以探讨其栓塞效能如弥散性和栓塞效果,同时摸索注入参数^[2]。

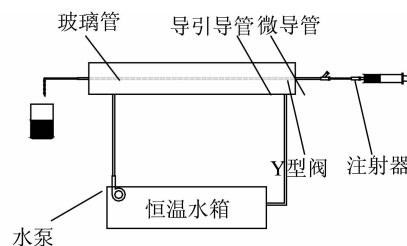
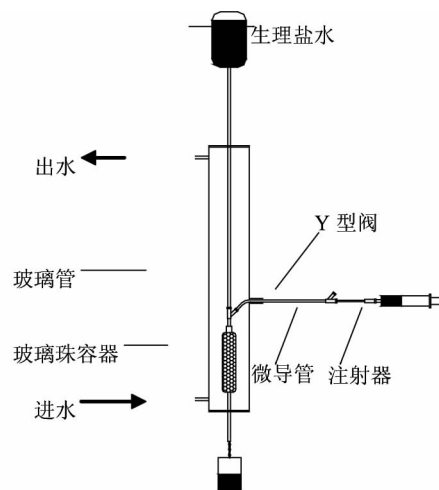


图1 栓塞材料在导管内输送模拟实验装置



玻璃管中的循环水和冲洗用的生理盐水均为 37℃

图2 体外 AVM 模型栓塞装置

2 结果

2.1 共聚物物理性质测试

共聚物合成纯化后经检测单体残留量为 $1.632 \times 10^{-5} \text{ g/ml}$,可以满足医用要求。聚合物的特性黏度范围 7.79 ~ 5.46 ml/g,黏均分子量范围(20℃)为 $28.85 \times 10^6 \sim 14.18 \times 10^6$,聚合物的剪切黏度在 11 ~ 13 mPa·s,加入对比剂之后,黏度增大到 24 ~ 37 mPa·s。聚合物的 LCST 范围为 36.32 ~ 24.71℃(见表1)。共聚物溶液滴入 37℃ 生理盐水后,溶液由透明逐渐变为白色不透明絮状沉淀物(图3)。溶液由透明变为不透明膜状物的时间为沉淀时间,约为 3.2 s。

表 1 共聚物物理性质的测试比较

共聚物编号	LCST(°C)	$[\eta](\text{ml/g})$	$M(\times 10^6)$
1	36.32	7.79	28.85
2	33.92	6.17	18.1
3	30.63	5.46	14.18
4	27.49	3.94	7.4
5	24.71	3.9	7.24



共聚物在 37°C 水中变为白色絮状沉淀物

图 3 共聚物随温度改变

生物检测表明,样品无菌生长,内毒素含量 $< 0.5 \text{ EU/mL}$,溶血率 0.5%,无急性全身毒性,细胞毒性反应 II 级,无皮内刺激反应,致敏率 0,植入体内 4、12 和 26 周后,炎症反应程度符合 GB/T16175 中的规定,无遗传毒性反应,砷含量 $< 1.0 \mu\text{g/g}$,重金属含量 $< 10.0 \mu\text{g/g}$,pH 值 4.92,NIPAM 单体残余量 $0.04 \mu\text{g/g}$ 。全性能检测符合标准要求。

2.2 体外模拟输送模拟试验

根据物理性质测定,LCST 合适的共聚物 1 和 2 (1%浓度)进行试验。利用该装置验证制备的栓塞材料,结果发现用 TMEDA 和 KPS 作为引发体系的聚合物,在聚合单体浓度大时,聚合物溶液中有块状交联物,容易堵塞微导管;而聚合单体浓度小时,没有块状交联物,但是沉淀时只是得到混浊的溶液,达不到栓塞的目的。针对该情况,我们改进了引发体系,用 Na_2SO_3 和 KPS 引发体系制备了一系列聚合物,进行了输送模拟试验。该引发体系的聚合物,有很好的输送效果,当聚合物的相对分子质量足够大时,可沉淀成为凝胶达到栓塞的目的。通过实验,我们发现共聚物 1 和 2 可以达到栓塞目的。

2.3 体外栓塞效果模拟试验

考虑到文献报道 NIPAM 有潜在的神经毒性,我们选用共聚物 2 水溶液(1%),应用 Magic 1.8 F 或 Prowler 14 微导管进行介入栓塞实验。共栓塞了 7 个玻璃珠容器,栓塞时栓塞剂推注速度为 $0.01 \sim 0.017 \text{ ml/s}$,栓塞剂推注前后均用冷生理盐水冲洗微导管。栓塞过程中未见栓塞剂通过玻璃珠容器流

出,栓塞剂在玻璃珠容器中弥散均匀,平均每个玻璃珠容器完全栓塞所用 1%共聚物 2 的量为 35.2 ml ,共计推注时间 2816 s 。每个玻璃珠容器栓塞均在使用微导管的情况下完成(图 4)。栓塞后在 37°C 水中剖开微导管,均未见共聚物黏附在微导管内壁,微导管内壁光滑完整。



共聚物在玻璃珠容器中弥散均匀

图 4 共聚物的特性

3 讨论

3.1 AVM 栓塞材料研究现状

介入性血管内栓塞是治疗 AVM 的一种重要手段,而栓塞材料的选择对于 AVM 的治疗效果起着极为重要的作用。液体性栓塞材料弥散效果较好^[3],能较好地弥散到畸形血管团内形成铸型,防止畸形血管团侧支循环建立,起到永久性栓塞和预防 AVM 复发的作用。目前应用最多的液体栓塞材料是 NBCA,在血液中遇游离氢离子迅速聚合而铸型,栓塞效果持久。但是,NBCA 容易将输送微导管粘连到血管壁,导致严重的并发症。早在 2002 年,Komemushi 等^[4]在进行动物实验中,用新型液体栓塞剂:Onyx(乙烯-乙烯基-乙醇共聚物)栓塞白兔肝动脉治疗肝癌获得可行性进展。经过数年的动物实验及临床实践的快速发展,2010 年 Thiex 等^[5]报道将新型液体栓塞剂 Onyx 用于栓塞治疗成人脑动脉畸形,其安全性和有效性已得到临床证实。尽管如此,用于小儿脑动静脉畸形治疗的临床数据较少,Thiex 等取得一些有意义统计学数据。

由于 DMSO 具有血管毒性,注射速度缓慢,操作人员和患者在治疗过程中接触放射线剂量大为增加^[6];而且 DMSO 具有强腐蚀性,Onyx 用于栓塞治疗时需要专门与 DMSO 相兼容的输送微导管,操作者需要特殊的培训。现在处于动物实验阶段的丙烯酸甲酯共聚物,原理和 Onyx 基本相同,需要无水乙醇作为溶剂,操作也相对复杂,注射速度比较缓慢,容易导致供血动脉痉挛和血管内膜损害^[2,7]。研制新型无毒、非黏附性、生物相容好、容易操作的液体栓

塞材料对于 AVM 的血管内栓塞治疗十分重要^[8-12]。

3.2 温度敏感性栓塞材料的研究

1996 年 Matsumaru 等^[13]应用 NIPAM 和 NNPAM 合成共聚物,进行共聚物物理性质测定,在流体模型中观察共聚物沉淀过程,同时应用氮-异丙基丙烯酸酰胺和氮-正丙基丙烯酸酰胺摩尔比为 38:62 的共聚物水溶液栓塞了一只新西兰白兔的肾动脉,并应用 7 周龄的 CDF1 小鼠进行毒性实验。组织学检查发现,共聚物可以栓塞直径 100~200 μm 的小血管,未引起验证反应或血管内膜损害。急性毒性试验表明,小鼠接受 2 000 mg/kg 剂量的共聚物后未有死亡,血生化指标和肝、肾、脾脏器重量和组织学未见异常。

3.3 本研究的特点

本研究对 5 种配比共聚物进行了物理性质测定,并进行体外输送模拟试验和体外栓塞效果模拟试验,其中,物理性质测定与文献报道相似。与文献不同的是,我们为了日后临床实验研究的需要,在共聚物水溶液中加入 300 mg/ml 的碘海醇作为对比剂。生物检测表明,样品无菌生长,内毒素含量 < 0.5 EU/ml,溶血率 0.5%,无急性全身毒性,细胞毒性反应 II 级,无皮内刺激反应,致敏率 0%,植入体内 4、12 和 26 周后,炎症反应程度符合 GB/T 16175 中的规定,无遗传毒性反应,砷含量 < 1.0 $\mu\text{g/g}$,重金属含量 < 10.0 $\mu\text{g/g}$,pH 值 4.92,NIPAM 单体残余量 0.04 $\mu\text{g/g}$ 。全性能检测符合标准要求。

通过体外模拟试验,共聚物水溶液能有效栓塞体外模型,栓塞物在模型中弥散均匀,能有效阻断通过模型的水流。栓塞同一个模型均在同一支微导管的情况下完成,未发生堵管现象,栓塞后微导管管腔内未见共聚物黏附,管腔内壁光滑。该共聚物具有 LCST 特性,具有溶于水、非黏附性的特点。相对于 NBCA 栓塞过程中需要更换微导管和难于操作,Onyx 栓塞需要 DMSO 相兼容的微导管和血管毒性,该共聚物有望成为一种有前景的液体栓塞材料。该共聚物还需要进一步动物模型栓塞试验,以证实其对 AVM 的栓塞效果。最近 Hiroyuki 等^[14]利用温敏材料栓塞猪的肾动脉取得了良好的效果,血管炎性反应轻微,不黏输送微导管。

NIPAM 和 NNPAM 共聚物具有 LCST 特性和溶于水、无毒性、非黏附性的特点,是一种 AVM 血管内栓塞治疗的新型液体栓塞材料,在进行动物模型的栓塞实验基础上,可进一步用于临床试验研究。

[参 考 文 献]

- [1] Elhammady MS, Wolfe SQ, Farhat H, et al. Onyx embolization of carotid-cavernous fistulas[J]. Neurosurgery, 2010, 112: 589 - 894.
- [2] Kazekawa K, Iwata H, Shimozuru T, et al. Nontoxic embolic liquids for treatment of arteriovenous malformations[J]. J Biomed Mater Res, 1997, 38: 79 - 86.
- [3] Abdel Kerim A, Bonneville F, Jean B, et al. Balloon-assisted embolization of skull base meningioma with liquid embolic agent [J]. Neurosurgery, 2010, 112: 70 - 72.
- [4] Komemushi A, Tanigawa N, Okuda Y, et al. A new liquid embolic material for liver tumors [J]. Acta Radiologica, 2002, 43: 186 - 191.
- [5] Thies R, Williams A, Smith E, et al. The use of Onyx for embolization of central nervous system arteriovenous lesions in pediatric patients[J]. AJNR, 2010, 31: 112 - 120.
- [6] Andrews RT, Brown PH. Uterine arterial embolization: factors influencing patient radiation exposure [J]. Radiology, 2000, 217: 713 - 722.
- [7] 盛希忠, 刘作勤. 非黏附性液体栓塞材料的研究进展[J]. 医学影像学杂志, 2004, 14: 852 - 854.
- [8] Eriksson LG, Mulic-Lutvica A, Jangland L, et al. Massive postpartum hemorrhage treated with transcatheter arterial embolization: technical aspects and long-term effects on fertility and menstrual cycle[J]. Acta Radiol, 2007, 6: 635 - 642.
- [9] Itkin M, Kucharczuk JC, Kwak A, et al. Nonoperative thoracic duct embolization for traumatic thoracic duct leak: experience in 109 patients[J]. Thoracic Cardiovasc Surg, 2010, 139: 584 - 589.
- [10] Descargues G, Mauger Tinlot F, Douvrin F, et al. Menses, fertility and pregnancy after arterial embolization for the control of postpartum Haemorrhage[J]. Hum Reprod, 2004, 19: 339 - 343.
- [11] Ornan D, White R, Pollak J, et al. Pelvic embolization for intractable postpartum hemorrhage: long-term follow-up and implications for fertility[J]. Obstet Gynecol, 2003, 102: 904 - 910.
- [12] Klamroth R, Gottstein S, Essers E, et al. Successful angiographic embolization of recurrent elbow and knee joint bleeds in seven patients with severe haemophilia[J]. Haemophilia, 2009, 15: 247 - 252.
- [13] Matsumaru Y, Hyodo A, Nose T, et al. Application of thermosensitive polymers as a new embolic material for intravascular neurosurgery[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 1996, 7: 795 - 804.
- [14] Takao H, Murayama Y, Ebara M, et al. New thermoreversible liquid embolic agent for embolotherapy: technical report [J]. Neuroradiology, 2009, 51: 95 - 98.

(收稿日期:2010-01-25)