

## • 实验研究 Experimental research •

## 丹参酮ⅡA-聚乳酸/羟基乙酸微球对兔肝动脉栓塞作用的研究

陈红宇, 李琦, 陈庆华, 赵泽华, 韩蕾, 王之, 徐嵩森, 王炎

**【摘要】 目的** 观察经肝动脉注入丹参酮ⅡA-聚乳酸/羟基乙酸微球对兔肝动脉的栓塞作用。**方法** 新西兰兔 24 只在 DSA 监视下经肝动脉注入丹参酮ⅡA 微球, 注入后 10 min, 1、3、7、14、21、30、42 d 各取 3 只再次造影, 观察肝动脉栓塞情况, 并处死取肝、心、脾、肺、肾和胃组织, 观察病理变化, 同时作血常规和肝、肾功能检查。**结果** 栓塞后 10 min 造影显示, 肝动脉末梢血管消失。栓塞后第 1、3、7、14、21、30 d 造影, 肝动脉末梢血管均未显影。栓塞后第 42 d 造影显示肝动脉末梢血管已显影。病理切片显示栓塞部位出现炎性及坏死。常规和生化结果: 介入栓塞后白细胞出现一过性升高, 第 7 d 恢复正常水平 ( $P > 0.05$ ); AST、ALT 均在栓塞后第 3 d 达到最高值, 第 7 d 恢复正常水平 ( $P > 0.05$ )。**结论** 丹参酮ⅡA 微球具有良好的肝动脉末梢栓塞效果, 栓塞时间在 30 ~ 42 d, 是一种理想的肿瘤介入栓塞剂。

**【关键词】** 丹参酮ⅡA; 微球; 聚乳酸/羟基乙酸; 栓塞; 介入

中图分类号: R73-3 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2010)-12-0977-05

**The embolization effect of tanshinone II A-polylactic acid/glycolic acid microspheres on the hepatic artery in experimental rabbits** CHEN Hong-yu, LI Qi, CHEN Qing-hua, ZHAO Ze-hua, HAN Lei, WANG Zhi, XU Song-sen, WANG Yan. Laboratorial Center, Putuo Hospital to Affiliated, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Institute of Interventional Oncology, Shanghai 200062, China

Corresponding author: WANG Yan, E-mail: bw0999@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To observe the embolization effect of tanshinone II A-polylactic acid/glycolic acid microspheres (PLGA) on the hepatic artery in experimental rabbits. **Methods** Under DSA guidance, hepatic catheterization and angiography was performed in 24 New Zealand white rabbits. Via the catheter tanshinone II A-PLGA microspheres was injected into the hepatic arteries. Each time at 10 minutes and on the 1 st, 3 rd, 7 th, 14 th, 21 st, 30 th and 42 nd day after the treatment, every three rabbits were randomly selected for the re-examination with angiography to observe the embolization state of the hepatic arteries, then the animals were sacrificed and the liver, heart, spleen, lung kidney and stomach were removed and sent for pathologic exam. Simultaneously, the functional tests of liver and kidney as well as the routine blood tests were made. The results were evaluated. **Results** The peripheral micro-vessels of the hepatic artery vanished away at 10 minutes after embolization, and they remained un-visualized till the 30th day after embolization. On the 42nd day after embolization the peripheral micro-vessels of the hepatic artery could be visualized again. Pathologically, signs of inflammation and necrosis appeared in the occluded areas. Blood biochemical examination showed that there was a transient elevation of white blood cells after the procedure, which fell to normal level on the 7th day ( $P > 0.05$ ). Both AST and ALT reached their peaks on the 3rd day, then they decreased gradually and returned to normal on the 7th day ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Tanshinone II A-PLGA microspheres have better embolization effect on the hepatic arteries, this effect lasts for 30 to 42 days. Therefore, tanshinone II A-PLGA microsphere is an ideal embolization agent for the treatment of neoplasm. (J Intervent Radiol, 2010, 19: 977-981)

**【Key words】** tanshinone II A; microsphere; polylactic acid/glycolic acid; embolization; intervention

基金项目: 上海市重点学科资助项目(No.S30302); 上海市卫生局青年基金资助项目(No.2009Y91)

作者单位: 200062 上海中医药大学附属普陀医院; 上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所(陈红宇、李琦、赵泽华、王之、徐嵩森、王炎); 上海医药工业研究院(陈庆华、韩蕾)

通信作者: 王炎 E-mail: bw0999@hotmail.com

经导管动脉栓塞 (transcatheter arterial embolization, TAE) 是通过栓塞肿瘤供血动脉诱导肿瘤缺血缺氧性坏死, 当结合动脉内灌注化疗药物 (即化疗栓塞) 或放射性物质 (即放疗栓塞), 则可导致更广泛的肿瘤坏死<sup>[1]</sup>。以栓塞为基础的介入疗法已成为目前治疗不可切除性肝癌的主要方法。然而, 目前临床上常用的栓塞剂仅能栓塞至肝动脉 2~3 级分支, 栓塞后侧支循环容易建立, 致使其近期疗效显著, 但远期疗效仍不够理想, 肝癌栓塞后肿瘤复发和转移是限制其疗效的主要因素<sup>[2-3]</sup>。药物微球由于其靶向、缓释、栓塞等多重特性, 成为一种新型的药物栓塞剂被广泛地应用于肝癌的治疗中。本研究采用乳化-溶剂挥发法制备丹参酮 II A-聚乳酸/羟基乙酸微球 (tanshinone II A-poly(lactic acid/glycolic acid) microspheres), 采用正常兔为实验研究对象, 探讨其对肝脏血管栓塞作用, 为丹参酮 II A-聚乳酸/羟基乙酸微球介入治疗肝癌提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性新西兰大白兔 (3 kg 左右), 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 饲养于上海中医药大学附属普陀医院动物房, 自由摄食饮水。

1.1.2 药物与试剂 丹参酮 II A-聚乳酸/羟基乙酸微球 (上海医药工业研究院研制), 微球粒径为 40~100  $\mu\text{m}$ , 平均粒径  $(45.09 \pm 14.69) \mu\text{m}$ , 丹参酮 II A 含量为 3.5% 左右; 地塞米松磷酸钠注射液 (上海通用药业股份有限公司); 肝素钠注射液 (江苏常州千红生化制药有限公司); 戊巴比妥钠 (上海菲达工贸有限公司); 碘普罗胺 (拜耳公司); 利多卡因 (上海禾丰制药有限公司)。

1.1.3 主要实验仪器 II 型血管造影用鞘 (日本 TERUMO 公司); DSA (菲利普公司); 全自动生化血液分析仪 (Beckman 公司); 水浴恒温箱 (上海精宏设备有限公司); 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); 切片机 (德国 Leico 公司); 普通光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 兔肝动脉介入栓塞方法 参照文献<sup>[4]</sup>的肝动脉插管方法, 将实验兔术前禁食 12 h, 以 2.5% 戊巴比妥钠 1 ml/kg 的剂量耳缘静脉麻醉后, 固定于手术台上, 剪去右侧腹股沟区毛后, 常规消毒、铺巾, 根据腹股沟区血管走向纵行切开皮肤, 暴露出股动脉鞘, 钝性分离股动脉约 3 cm, 于分离出的股

动脉近端、远端分别穿 4 号丝线各 1 支, 远端结扎后提起, 用 18 G 塑料套管穿刺针穿入股动脉后, 退出穿刺针见有鲜红色血液喷出, 退出塑料套管穿后置入微导丝及 4 F 管鞘并接防返流阀, 顺 4 F 管鞘送入 4 F 导管, 导管经股动脉、髂动脉进入腹主动脉, 导管头端于 T12~L1 水平处, 对比剂以 1 ml/s、总量 3 ml 做腹主动脉造影, 确定腹腔动脉开口后, 将“J”型导管进入腹腔动脉以 1 ml/s、对比剂总量 3 ml 做腹腔动脉造影, 了解肝血管的走行后, 沿 4 F 导管置入 2 F 微导管进一步超选至肝固有动脉处, 对比剂以 0.5 ml/s 造影观察肝左右动脉血管情况, 造影后以 10 mg/kg 剂量注入丹参酮 II A 微球 3 ml 栓塞肝动脉, 栓塞后 10 min 再次微导管造影观察肝内血管情况。完成全部操作后拔管, 结扎股动脉近端, 缝合皮肤, 消毒后回笼。

1.2.2 检测方法及指标 实验兔 24 只在 DSA 下经肝动脉注入丹参酮 II A 微球, 于注入后 10 min, 1、3、7、14、21、30、42 d 各时间点取 3 只再次造影, 观察肝动脉栓塞情况, 并于各时间点处死家兔, 取肝、心、脾、肺、肾、胃组织固定于 4% 的甲醛溶液中, HE 染色观察病理变化。各只家兔于肝动脉介入栓塞后 1、3、7、14、21、30 d 采血, 作肝、肾功能及血常规检查。

## 2 结果

### 2.1 丹参酮 II A 微球血管栓塞作用

兔肝动脉栓塞前, 肝固有动脉造影显示, 肝左、肝右动脉及末梢微血管显影清晰; 栓塞后 10 min 造影, 肝左、肝右动脉远端及末梢微血管不显影; 栓塞后 30 d 再次肝动脉造影显示肝左、肝右动脉远端及末梢血管均未显影; 栓塞后 42 d 肝动脉造影显示, 肝左右动脉远端及末梢微血管已显影 (图 1)。

### 2.2 介入栓塞后各时间点家兔脏器病理改变

丹参酮 II A 微球肝动脉栓塞后 3 d 可见肝细胞体积增大, 胞质呈半透明的疏网状, 肝细胞坏死轻微, 可见点状坏死, 汇管区可见大量炎细胞浸润, 肝窦充血, 门静脉扩张。7 d 后可见肝细胞水肿减轻, 肝细胞呈小片状坏死。14 d 后可见肝细胞炎性反应减轻, 肝小叶中央静脉与汇管区之间, 2 个中央静脉之间出现互相连接的肝细胞坏死带肝细胞呈桥连坏死, 炎性细胞明显减少。21 d 后可见肝细胞黏液变性、凝固性坏死。30 d 后在肝细胞变性、坏死的基础上, 继发汇管区肝细胞纤维组织增生 (图 2)。心、脾、肾、胃组织未见明显改变。

### 2.3 肝动脉介入栓塞后对肝、肾功能及血象的影响

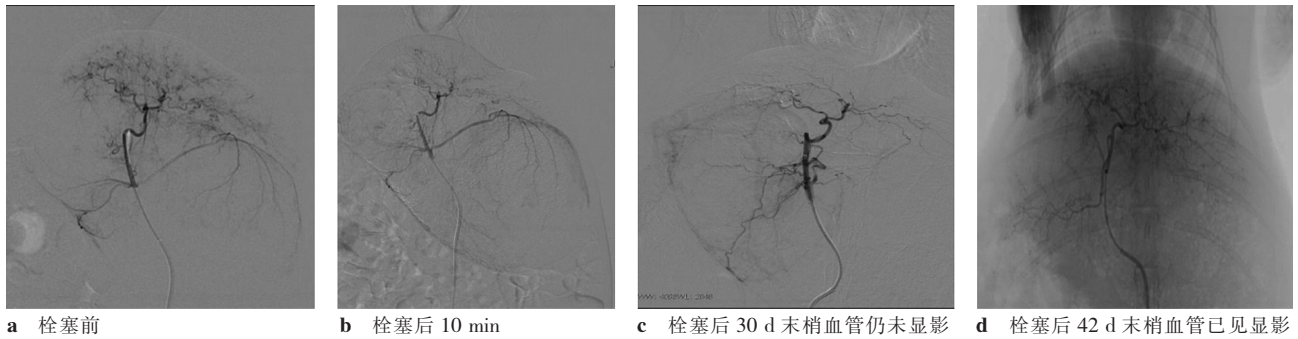


图1 肝动脉栓塞前后 DSA 图像

兔肝动脉介入栓塞后第 1 d 白细胞达到最高值, 第 3 d 开始下降, 第 7 d 恢复正常水平 ( $P > 0.05$ )。AST、ALT 均在栓塞后第 3 d 达到最高值, 第 7 d 恢复正常水平 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。肝功能其他指标 DBIL、TBIL、GGT、TP、ALP、ALB、肾功能 BUN、CREA 以及 Hb、RBC、PLT 等与栓塞前比较无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

大多数原发性肝癌(HCC)患者就诊时多已属晚期,对不能手术切除的患者,肝动脉化疗栓塞术(TACE)是一种有效的治疗方法<sup>[5]</sup>。随着介入放射学的发展,采用 TACE 治疗的 HCC 患者的生存率和生存期有了明显提高,但中、长期疗效仍不能令人满意<sup>[6-7]</sup>。目前在常规栓塞剂明胶海绵、无水乙醇、碘油、聚乙烯醇中,明胶海绵属于小动脉栓塞水平的

栓塞剂,其优点在于无抗原性、易得、廉价、能消毒,可按需要成不同大小和形状,摩擦系数低,用一般的血管造影导管即可快速注射,但明胶海绵易被组织吸收,闭塞血管时间短,同时可引起血管内膜炎性反应,栓塞效果欠佳<sup>[8]</sup>。无水乙醇可通过损伤微小血管内膜,使血液中蛋白变性,形成凝固的混合物以栓塞小血管,也可以造成较粗动脉的栓塞,其优点是栓塞物不易被吸收,微血管栓塞后不易建立侧支循环,是一种很好的长效栓塞剂,但作为液体栓塞剂,在栓塞过程中容易造成反流误栓,产生梗死性坏死及脓肿形成等严重并发症<sup>[9]</sup>。碘油目前是临床治疗肝癌首选的栓塞剂,具有低黏度、易于经较细导管注射的特点,应用碘油-化疗药乳剂行肝癌的栓塞治疗,已在临床上取得了良好疗效<sup>[10]</sup>,但由于碘油易流动,需多次栓塞才能达到疗效<sup>[11]</sup>。聚乙烯醇(PVA)颗粒是由聚乙烯醇泡沫与甲醛混合制成的

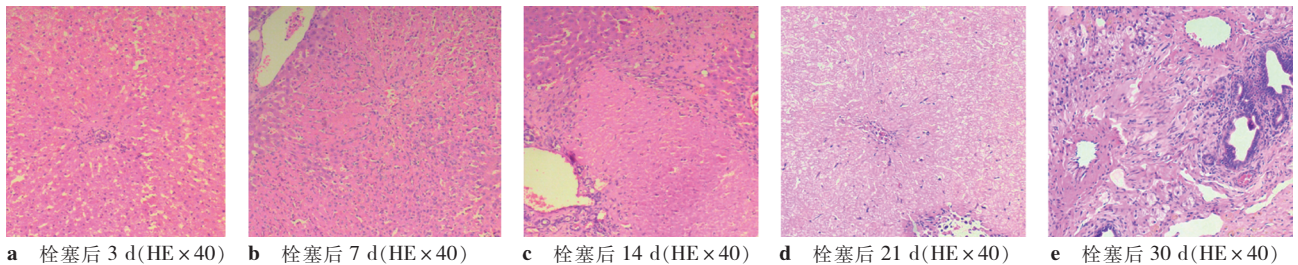


图2 栓塞前后肝组织病理变化

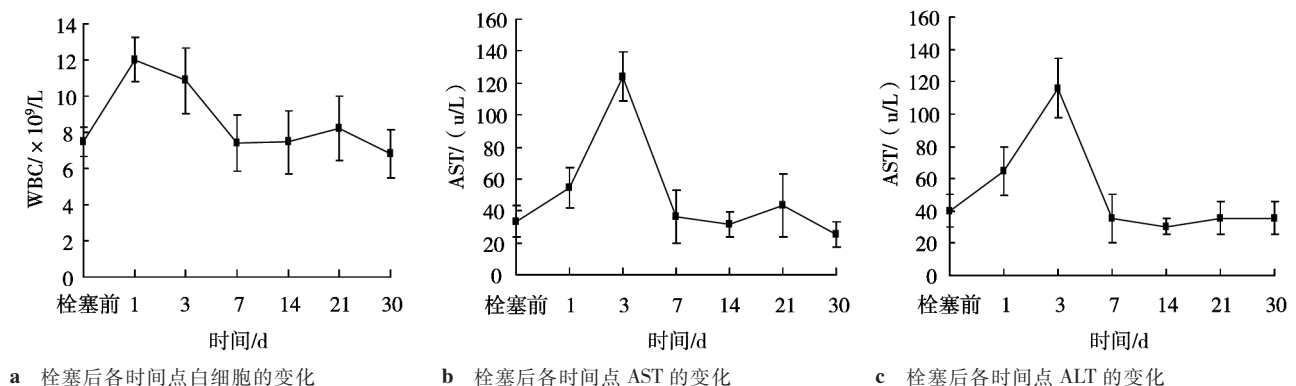


图3 栓塞前后血生化指标的变化

一种化合制剂,栓塞效果好,但价格昂贵,不利于推广<sup>[12]</sup>。因此研制低毒、效果好、靶向的介入栓塞材料成为提高肝癌栓塞疗效的发展方向。

药物微球是近年来发展的一种药物新剂型<sup>[13]</sup>,在发挥栓塞作用的同时微球中的药物可集中在肿瘤区释药,故既可产生栓塞效应,又可作为抗癌药物的携带者,使肿瘤区的药物长时间的维持在较高浓度水平,起到良好的被动靶向抗癌作用,显著降低化疗药物的系统毒性,具有控释、末梢栓塞和靶向等多重功效<sup>[14]</sup>。

丹参酮ⅡA(tanshinoneⅡA,TSⅡA)为中药丹参主要有效成分之一,最早用于治疗心脑血管疾病。近年研究发现,TSⅡA对肝癌、胃癌等多种肿瘤细胞具有显著的杀伤作用,引起了人们的广泛关注<sup>[15-16]</sup>。课题组前期研究也表明TSⅡA能够显著的抑制小鼠肝癌瘤体生长,延长生存期,其抗肝癌的主要机制是诱导细胞凋亡<sup>[17-18]</sup>。由于TSⅡA在水中溶解度小,含TSⅡA的普通制剂(如片剂、胶囊等),其生物利用度均不高,直接影响临床疗效。因此,我们采用了O/W型乳化-液中干燥法,以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体,制备可生物降解的缓释栓塞微球,经肝动脉介入给药后,一方面通过选择性栓塞肿瘤血管引起肿瘤缺血、缺氧而坏死,另一方面微球中的药物在局部缓慢释放,延长药物对肿瘤组织的作用时间,提高局部药物浓度,从而降低全身毒性,达到减毒增效的目的。

正常人的肝血窦宽7~15 μm,毛细血管管径一般为6~8 μm。TSⅡA微球直径为40~100 μm,可栓塞至肝内动脉吻合支(<300 μm)水平,这样可以减少对正常组织的损害,同时也提高了局部治疗效果。因此,TSⅡA微球用于肝动脉栓塞既可有效阻断肿瘤血流,又能保持正常组织血流灌注,用于人体相对安全,不会造成异位栓塞。同时,聚乳酸/羟基乙酸(PLGA)作为一种新型的医用生物可降解高分子材料,有良好的生物相容性和安全性<sup>[19]</sup>,进入人体后先降解为乳酸和羟乙酸,再进一步降解为二氧化碳和水排出体外,对人体无害,故可广泛作为微球控释药物的载体材料<sup>[20]</sup>。我们通过微导管超选至肝固有动脉注入TSⅡA微球,30 d后DSA下造影显示肝左右动脉远端及末梢血管均未显影,栓塞后42 d再次造影显示肝左右动脉远端及末梢血管已显影提示其栓塞作用在30~42 d。

本实验结果中,栓塞后第3 d血清AST、ALT水平平均达到最高峰,第7 d渐趋正常( $P > 0.05$ ),表

明使用丹参酮ⅡA-PLGA微球进行肝动脉栓塞,对兔肝功能可能有影响,肝功能很快恢复表明其影响是可恢复性的。同时由于术中灌注药物时肝动脉血流中断,肝脏出现缺血再灌注损伤,也可导致血清AST、ALT的升高。介入栓塞后出现的一过性白细胞升高,可能是由于肝动脉介入栓塞后,被栓塞部位组织坏死后的炎性反应所致,但3 d后即开始逐渐下降,7 d恢复正常。肝功能其他指标DBIL、TBIL、GGT、TP、ALP、ALB,肾功能BUN、CREA以及Hb, RBC,PLT等与栓塞前比较无明显差异( $P > 0.05$ ),提示超选择至肝固有动脉介入栓塞给药,可降低体循环中药物浓度,减少对正常组织的损害,提高了局部治疗效果。

#### [参考文献]

- [1] Brown DB, Gould JE, Gervais DA, et al. Transcatheter therapy for hepatic malignancy: standardization of terminology and reporting criteria[J]. J Vasc Interv Radiol, 2007, 18: 1469 - 1478.
- [2] Biolato M, Marrone G, Racco S, et al. Transarterial chemoembolization (TACE) for unresectable HCC: a new life begins[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2010, 14: 356 - 362.
- [3] Lee JK, Chung YH, Song BC, et al. Recurrences of hepatocellular carcinoma following initial remission by transcatheter arterial chemoembolization [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17: 52 - 58.
- [4] Lee KH, Liapi E, Buijs M, et al. Considerations for Implantation Site of VX2 Carcinoma into Rabbit Liver [J]. J Vasc Interv Radiol, 2009, 20: 113 - 117.
- [5] Kawamura Y, Ikeda K, Kumada H. Strategy for advanced hepatocellular carcinoma unresponsive to transcatheter arterial chemoembolization using epirubicin[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2010, 37: 402 - 407.
- [6] 李琦, 凌昌全. 原发性肝癌的介入治疗临床研究进展[J]. 临床消化病学杂志, 2001, 13: 94 - 96.
- [7] 李琦, 凌昌全. 中药经肝动脉介入治疗原发性肝癌的现状、存在的问题及对策[J]. 中医杂志, 2002, 43: 67 - 72.
- [8] Gu R, Sun W, Zhou H, et al. The performance of a fly-larva shell-derived chitosan sponge as an absorbable surgical hemostatic agent [J]. Biomaterials, 2010, 31: 1270 - 1277.
- [9] Yu SC, Hui EP, Wong J, et al. Transarterial ethanol ablation of hepatocellular carcinoma with lipiodol ethanol mixture: phase II study[J]. J Vasc Interv Radiol, 2008, 19: 95 - 103.
- [10] Molinari M, Kachura JR, Dixon E, et al. Transarterial chemoembolisation for advanced hepatocellular carcinoma: results from a North American cancer centre [J]. Clin Oncol, 2006, 18: 684 - 692.
- [11] Dumortier J, Chapuis F, Borson O, et al. Unresectable hepatocellular carcinoma: survival and prognostic factors after

- lipiodol chemoembolisation in 89 patients [J]. Dig Liver Dis, 2006, 38: 125 - 133.
- [12] Andrews RT, Binkert CA. Relative rates of blood flow reduction during transcatheter arterial embolization with trisacryl gelatin microspheres or polyvinyl alcohol: quantitative comparison in a swine model[J]. J Vasc Interv Radiol, 2003, 14: 1311.
- [13] Li JQ, Wang SL, Xu F, et al. Therapeutic effectiveness of slow-release PLGA-oxaliplatin microsphere on human colorectal tumor-bearing mice [J]. Anticancer Drugs, 2010, 21: 600 - 608.
- [14] Nijssen F, Rook D, Brandt C, et al. Targeting of liver tumour in rats by selective delivery of holmium-166 loaded microspheres: a biodistribution study[J]. Eur J Nucl Med, 2001, 28: 743 - 749.
- [15] Zhong ZH, Chen WG, Liu YH, et al. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human hepatoma cell line HepG2 by tanshinone IIA [J]. Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban, 2007, 32: 99 - 103.
- [16] Zhou L, Chan WK, Xu N, et al. Tanshinone IIA, an isolated compound from *Salvia miltiorrhiza* Bunge, induces apoptosis in HeLa cells through mitotic arrest [J]. Life Sci, 2008, 83: 394 - 403.
- [17] Li Q, Wang Y, Feng N, et al. Novel polymeric nanoparticles containing tanshinone IIA for the treatment of hepatoma [J]. J Drug Target, 2008, 16: 725 - 732.
- [18] 李琦, 王炎, 范忠泽, 等. 丹参酮 IIA 及其纳米粒诱导肝癌细胞凋亡及对 p38 MAPK、TGF- $\beta$  信号蛋白表达的影响 [J]. 肿瘤, 2008, 28: 8 - 12.
- [19] Schnieders J, Gbureck U, Thull R, et al. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly (lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement [J]. Biomaterials, 2006, 27: 4239 - 4249.
- [20] Rosa M, Elorza B, Torrado S, et al. Improvement of gentamicin poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for treatment of osteomyelitis induced by orthopedic procedures [J]. Biomaterials, 2007, 28: 877 - 885.

(收稿日期:2010-07-05)

## ·消 息·

## 第十二届中国肿瘤介入大会暨第二届亚太肿瘤介入大会 (APCIO 2011) 第一轮会议通知

为更好的促进国内及亚太地区肿瘤介入技术的交流与发展,由中国抗癌协会肿瘤介入专业委员会、亚太肿瘤介入学会 (APSIO) 主办,浙江省肿瘤医院、浙江省抗癌协会肿瘤介入专业委员会承办的全国肿瘤介入大会暨第二届亚太肿瘤介入大会 (APCIO 2nd) 将于 2011 年 10 月 27-30 日在杭州第一世界酒店举办。

会议将邀请国内以及亚太其他国家介入方面知名的专家参会,对介入医学最新动态以及典型病例等学术焦点作深入探讨。欢迎从事放射介入、肿瘤影像、超声介入、靶向治疗、肿瘤微创介入治疗的内、外科的医、护、技及研究人员参会。

### 一、征文内容

①肿瘤介入治疗进展;②抗癌药物进展;③肿瘤的栓塞治疗;④肝癌的精细治疗;⑤肿瘤的消融治疗;⑥典型病例分析。

### 二、征文要求

- (1) 论文必须是未公开发表过的资料;
- (2) 论文要求科学性强、数据可靠、重点突出、文字简练;
- (3) 请附 1000 字以内的论文摘要一份,内容含目的、方法、结果和结论;
- (4) 稿件一律采用 Word 格式,通过电子邮件发送至 E-mail: APCIO2011@YAHOO.CN
- (5) 截稿日期:2011 年 8 月 31 号;

中国抗癌协会肿瘤介入专业委员会  
亚太肿瘤介入学理事会  
浙江省抗癌协会肿瘤介入专业委员会  
浙江省肿瘤医院  
2010 年 11 月 20 日