

甲氨蝶呤明胶微球经肝动脉灌注后近期毒性的实验研究

郝楠馨 贾雨辰 陈庆华 陆伟根

摘要:通过肝动脉灌注的实验研究旨在了解甲氨蝶呤明胶微球(MTX-ms)的近期毒性作用,为这种新型化疗栓塞剂介入治疗肝癌的临床应用提供实验依据。经大白鼠肝动脉灌注后显示:与对照组和单纯 MTX 化疗组比较,较大剂量的 MTX-ms 可使动物血中 ALT 和 AKP 值暂时性升高,肝脏发生不同程度的变性坏死;12 天后肝组织坏死区小血管内仍可见大量微球滞留。其它主要脏器(心、脾、肺和肾脏)未发现与微球有关的病理改变。结果提示 MTX-ms 的化疗栓塞作用极强,能在小动脉水平有效地阻断肝动脉血流。MTX-ms 在阻断肝癌血供的同时可能导致正常肝组织的损害,临床应用时应注意微球剂量的掌握和避免使微球过多地流向正常肝实质。

关键词: 甲氨蝶呤明胶微球 肝动脉 实验 毒性 化疗栓塞

Experimental Study of Methotrexate Microspheres' Shortterm Toxicity after Hepatic Arterial Infusion

Hao Nanxin, Jia Yuchen, Chen Qinghua, et al.

Radiology Department of Shanghai Chang Zheng Hospital Attached
to The Second Military Medical University, Shanghai 200003

ABSTRACT: The aim of the experimental study is to investigate shortterm toxicity of an initial domestic Methotrexate microspheres (MTX-ms) by hepatic arterial infusion in rats, provide some experimental bases for clinic interventional treatment of liver carcinoma with this new chemoembolization agent. Comparing with control group and MTX group, MTX-ms of large doses could result in temporal rise of GPT and AKP, deterioration or necroses of animal's liver at different degrees, 12 days later a number of microspheres could still be found in the small arteries of the necrotizing area. No pathological changes related to microsphere could be found in other main organs (heart, spleen, lung and kidney). Results suggested that chemoembolization effect of MTX-ms is relatively strong; for effectively occluding blood flow of hepatic arteries on the level of small arteries. Meanwhile MTX-ms occlud blood supply of liver carcinoma, they may also cause damages of normal liver tissue. Clinically more attention ought to be paid to the dosage of MTXl microspheres and thus avoid the overflow of more microspheres to the normal liver tissue causing damage.

Key words: Methotrexate microspheres; Experiment; Toxicity; Hepatic artery Chemoembolization

对中晚期肝癌的治疗一直是医学研究的棘手课题之一。药物微球是近年来发展起来的新

作者单位: 200003 第二军医大学长征医院影像科(郝楠馨);第二军医大学长海医院放射科(贾雨辰);上海医药工业研究院(陈庆华 陆伟根)

型化疗栓塞剂,具有持续化疗与末梢栓塞的双重作用。它弥补了传统化疗与栓塞的缺陷,且能最大限度地减少全身的毒副作用^[1]。有结果显示药物微球的化疗栓塞优于常规注射化疗或栓塞,甚至可与肿瘤切除术媲美^[2]。药物微球被誉为理想的化疗栓塞剂。国内对药物微球的研究起步较晚,对其作用机理认识不深。本研究是临床前期对国内首创的 MTX-ms 经肝动脉灌注后的近期毒性进行实验研究。

材料和方法

一、材料

(一) MTX-ms 上海医药工业研究院提供。在显微镜下呈半透明黄色小球。其含药量为 10%(W/W)左右,粒径 $65 \pm 5 \mu\text{m}$,使用时与羧甲基纤维(CMC)生理盐水充分混合成混悬液。

(二) MTX 钠粉针剂 使用时用注射用水稀释成 MTX 溶液。

(三) 实验动物 采用 Wister 大白鼠 36 只,雌雄各半,体重 200~220g。将其分成 A、B 和 C 三组,每组 12 只。

二、方法

在乙醚麻醉下将大白鼠固定于仰卧位,先经股静脉抽血测定 GPT 和 AKP 值,然后剖腹暴露胃十二指肠动脉。在手术显微镜下经胃十二指肠动脉插入外径 0.3mm 的特制导管,并上行选择性进入肝固有动脉(图 1)。A 组:为对照组,经肝动脉导管注入生理盐水 0.1ml;B 组:为 MTX 组,按 2.5mg/kg 的药量注入 MTX 溶液,即 200g 的动物注入 0.5% 的 MTX 溶液 0.1ml,含 MTX 0.5mg;C 组:为 MTX-ms 组,微球的用量以所含的 MTX 计算,即 200g 的大白鼠注入 500mg/ml 的 MTX-ms-1.5% CMC 生理盐水混悬液 0.1ml,含 MTX 也是 0.5mg。

三组动物分别于肝动脉灌注后第 4、8 和 12 天从对侧股静脉穿刺抽血复查 GPT 和 AKP 值 4 只。然后处死动物,取其肝、心、脾、肺和肾脏组织做病理检查。所测得的 GPT 和

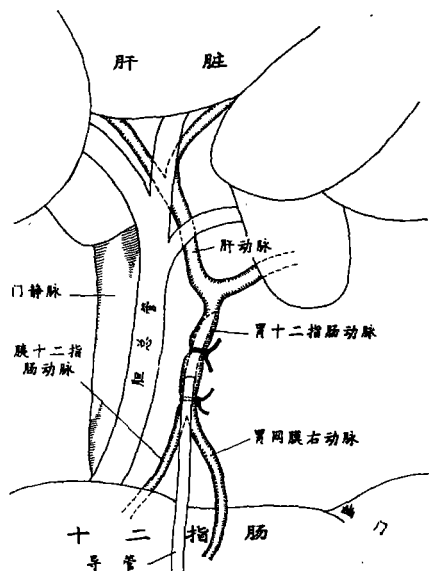


图 1. 大白鼠肝门部解剖及肝动脉插管示意图。

AKP 值用 Students't 检验进行统计学处理。

结 果

一、GPT 和 AKP 的变化

GPT 值: A 组在肝动脉灌注前后变化不大;B 组灌注后轻度升高;C 组灌注后第 8 天显著升高,但在第 12 天 B、C 两组均恢复正常,甚至低于灌注前水平(图 2)。AKP 值: A、B 两组在肝动脉灌注后未升高,第 4 天反而降低;C 组逐渐上升,第 8 天达高峰,虽然第 12 天时仍较高,但已显示下降趋势(图 3)。

Student's T 检验结果: 肝动脉灌注前三组动物的 GPT 和 AKP 值方差为齐性, t 检验无显著相差。灌注后不同时间 GPT 无显著相差(表 1),而与灌注前的差值于三组间比较显示第 8 天 A 和 C 组及第 12 天 B 和 C 组间相关显著($P < 0.05$, 表 2)。提示肝动脉灌注后第 8 天和 12 天 C 组 GPT 明显升高。灌注后三组间 AKP 值比较显示第 4 天和第 8 天 A 和 C 组、B 和 C 组间相差显著,且第 8 天 B 和 C 组间相关非常显著($P < 0.01$, 表 1)。灌注后不同时间 AKP 值和灌注前的差值于三组间比较显示灌注后第 8 天和第 12 天 A 和 B 组间相差显著

(表 2)。提示

C 组在肝动脉灌注后 AKP 显著升高。

表 1 肝动脉灌注前后三组动物间 GPT 和 AKP 值比较结果

比较组			手术前		术后第 4 天		第 8 天		第 12 天	
			GPT	AKP	GPT	AKP	GPT	AKP	GPT	AKP
A	vs	B	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
A	vs	C	NS	NS	NS	$P<0.05$	NS	$P<0.05$	NS	NS
B	vs	C	NS	NS	NS	$P<0.05$	NS	$P<0.05$	NS	NS

注: NS 为无显著差异

表 2 三组动物肝动脉灌注后不同时间 GPT 和 AKP 与灌注前的差值比较结果

比较组			手术前		术后第 4 天		第 8 天		第 12 天	
			GPT	AKP	GPT	AKP	GPT	AKP	GPT	AKP
A	vs	B	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
A	vs	C	NS	NS	NS	NS	$P<0.05$	$P<0.05$	NS	$P<0.05$
B	vs	C	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$P<0.05$	NS

注: NS 为无显著差异

二、主要脏器的病理变化

(一) 大体表现 A 组和 B 组在肝动脉灌注后不同时间肝脏和其它脏器均未见明显异常改变; C 组在灌注后三个时间均见肝脏不同程度的变性坏死, 从肝脏边缘散在的小坏死灶到整个肝叶坏死, 以第 8 天的坏死范围为最大, 大都发生在左侧叶和左中叶。坏死范围大者与周围组织如胃、十二指肠及大网膜等粘连。个别动物脾脏增大。其余脏器未见明显异常变化。说明 MTX-ms 的化疗栓塞作用明显强于单纯化疗。

(二) 镜下表现 1. 肝脏: A、B 两组中大

多数动物有肝细胞轻度混浊肿胀, B 组中个别动物肝组织有小片状坏死; C 组肝组织内均见范围大小不等的凝固性坏死。内有出血灶。坏死区肝小叶间动脉内常可见一至数十个微球, 多者呈串珠样排列, 与栓塞动脉相邻的肝小叶间静脉均显示不同程度扩张淤血。MTX-ms 呈嗜伊红均质状, 肝动脉灌注后第 4 天可见个别微球因降解而出现孔隙。随时间延长, 降解现象更明显和普遍。微球栓塞的小叶间动脉上皮细胞肿胀、血管壁结构疏松或胶原化, 甚至坏死。坏死区内见变性坏死的中性白细胞, 周围有程度不等的纤维细胞增生、单核细胞和淋巴细胞

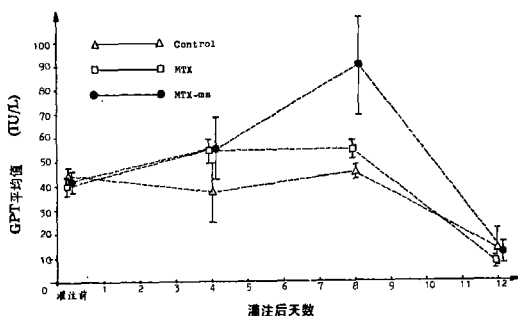


图 2. MTX-ms 肝动脉灌注前及灌注后不同时间三组动物血中平均 GPT 值变化图
I: 表示标准差

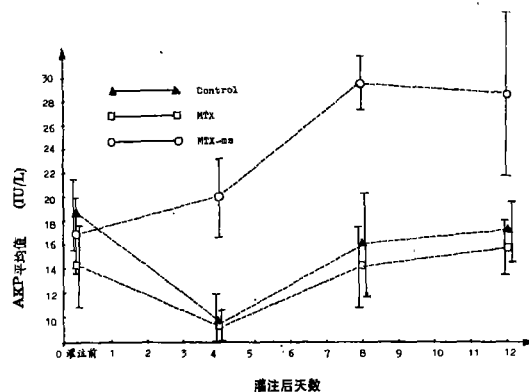


图 3. MTX-ms 肝动脉灌注前及灌注后不同时间三组动物血中平均 AKP 值变化图
I: 表示标准差

浸润。第 12 天见坏死区周围有增生的纤维肉芽组织,汇管区见胆管增生和纤维化。其余肝组织除某些区域肝细胞混浊肿胀或空泡变性等可逆性改变外,无明显异常。2. 心脏:三组中均有少数动物心肌间质充血,个别尚有灶性出血。大多数动物无异常改变。考虑与处死动物的应激反应有关。3. 脾脏:A、B 两组中约有一半的动物见脾窦充血扩张;C 组动物均有脾窦充血扩张,可能为肝组织坏死后窦前阻力增加所致。4. 肺脏:三组动物大多见肺泡间质血管充血,支气管粘膜下层少量淋巴细胞浸润。个别动物有支气管肺炎。B、C 两组中少数动物有灶性出血,甚至局限性肺水肿。考虑是由于天气因素导致动物受凉而易患支气管炎。B 和 C 组的化疗作用使用动物更易产生肺部炎症改变。5. 肾脏:三组动物均见近曲小管上皮细胞混浊肿胀,变性、肾小球轻度充血。但三组间无显著差别。除肝脏外其它脏器血管内未发现微球。

讨 论

一、药物微球的大小和分类

文献报道的药物微球多种多样,但都有两个最基本的特性,即末梢栓塞作用和药物缓释特性。要使肿瘤的血供阻断更完全和持久,就要求微球小到能到达肝动脉的末梢分支,而又不至于通过毛细血管和肝血窦。从现有的资料看,微球的大小大多在直径 $40\sim 300\mu\text{m}$ 之间,到底药物微球的粒径在多大范围内效果最佳尚无定论,我们认为用于临床的药物微球在直径 $100\mu\text{m}$ 左右较适宜。

药物微球的分类主要根据其基质的降解特性分为可生物降解性药物微球和不生物降解性药物微球。我们采用的是可生物降解性 MTX 明胶微球。

二、药物微球的末梢栓塞作用

就治疗肝癌而言,肝动脉的中央性栓塞因侧支循环形成较快,血流的阻断效果不理想。Bengmark^[3]等提出,防止肝内动脉循环的重建在治疗肝癌上可产生更好的效果。Doppman^[4]等发现肝动脉栓塞向末梢延伸能有效地防止侧

支循环的产生。肝动脉血流的阻断更完全和持久。微球的出现使肝动脉的末梢栓塞成为可能。当微球进入肝动脉后,大多停留在 $<100\mu\text{m}$ 的小动脉水平,能使肝动脉血流减少 $80\%\sim 100\%$ ^[5]。有些微球能在小动脉内停留数天至数周,栓塞动脉供应的肝组织因缺血缺氧而坏死。

Francis 提出肝动脉血流的阻断效果随微球剂量的增加而增强。但较大剂量的微球可导致正常肝组织梗死和肝功能异常。我们用较大剂量 MTX-ms(2.5mg/kg)肝动脉灌注后,所有动物肝脏均有不同程度梗死;MTX-ms 阻塞在小叶间动脉内,肝脏边缘有小梗死灶或大片坏死。但无一例动物死亡。肝动脉灌注后 12 天,小叶间动脉内可见许多微球。说明 MTX-ms 能在小动脉水平长时间阻断肝动脉血流。

三、药物微球的化疗栓塞作用

药物微球的疗效就是末梢栓塞和药物缓释作用的结合。药物微球注入肝动脉后,其所含药物的全身分布显著减少^[6]。实验表明灌注化疗的同时阻断肿瘤血供对肿瘤细胞有高度的杀伤作用。药物微球是普通微球基础上的一大进步。

药物微球的栓塞和化疗作用可相互加强,其表现在^[7,8]:① 动脉血流的减少或中断使药物向体循环的渗透减少或延缓;② 微球的基质对化疗药物有保护作用,使药物不至很快遭破坏而失活;③ 局部组织因缺血缺氧渗透性增加,有利于药物的渗透;④ 高浓度的化疗药物可使血管产生脉管炎甚至闭锁,进一步加强血流阻断效果。因此 Bechtei^[7]认为微球化的化疗药物对化疗栓塞来说是理想的。实验证明药物微球的化疗栓塞和传统动脉化疗、栓塞或两者的结合相比,在靶组织产生更明显和广泛的毒性。

然而药物微球对正常肝组织可能导致梗死等损害。尤其那些门静脉受侵的病人可能导致肝衰竭。但在肝肿瘤存在的情况下,由于肿瘤大多血供丰富以及虹吸作用的关系,微球有优先分布于肿瘤血管床的趋势。肝肿瘤比正常肝实质捕获高 $3\sim 4$ 倍微球的事实鼓励了微球栓塞治疗的发展^[9]。我们的实验显示肝脏有小范围

梗死的动物,GPT 和 AKP 也短时间升高,但 GPT 在 2 周后已恢复正常,AKP 也显示下降趋势。因此在使用大剂量微球治疗肝癌时,微球的抗肿瘤效果与肝损害之间存在着矛盾,解决这一问题的唯一方式就是选择性插管至肿瘤的供血动脉,避免微球流向正常肝实质。

自从 1981 年 Kato^[10]等开始用药物微球治疗肝癌病人以来,各种药物微球在临床上得到了广泛的应用,证明能显著延长肿瘤病人的生存时间,肿瘤因广泛坏死而缩小,AKP 明显降低。我们的结果也显示 MTX-ms 的化疗栓塞作用极强,其作用明显优于常规灌注化疗。国内近几年也开始将药物微球用于治疗肝癌。我们与上海医药工业研究院开发的 MTX-ms 旨在为临床提供一种新型有效的化疗栓塞剂。初步的临床试用显示其能有效地用于临床治疗肝癌。

参考文献

1. Kato T, Nemoto R, Mori H, et al. Studies on microencapsulated drugs. V. Chemoembolization effects of intraarterial infusion with microencapsulated mitomycin C. *Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi* 1979; 14:1150.
2. Ohnishi K, Tsuchiya S, Nakayama T, et al. Arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma with mitomycin C microcapsules. *Radiology* 1984; 152:51.
3. Bengmark S, Fredlund P, Hafstrom LO, et al. Present experiences with hepatic dearterialization in liver neoplasm. *Prog Surg* 1974;13:141.
4. Doppman JL, Girton M, Kahn ER. Proximal versus peripheral hepatic artery embolization: experimental study in monkeys. *Radiology* 1978;128:577.
5. Dakhill S, Ensminger W, Cho K, et al. Improved regioned selectivity of hepatic arterial BCNU with degradable microspheres. *Cancer* 1982;50:631.
6. 郝楠馨,贾雨辰,陈庆华,等.甲氨蝶呤明胶微球肝动脉灌注后的药代动力学研究. *癌症* 1992;11:218.
7. Bechtei W, Wright KC, Wallace S, et al. An experimental evaluation of microcapsules for arterial chemoembolization. *Radiology* 1986;161:601.
8. Okamoto Y, Konno A, Togawa K, et al. Arterial chemoembolization with cisplatin microspheres. *Br J Cancer* 1986;53:369.
9. Thulin L, Tyden G, Nyberg B, et al. Reduction of hepatic arterial flow by degradable microspheres in patients with liver tumor. *Acta Clin Scand* 1986; 152:447.
10. Kato T, Nemoto R, Mori H, et al. Arterial chemoembolization with mitomycin C microcapsules in the treatment of primary or secondary carcinoma of the kidney, liver, bone and intrapelvic organs. *Cancer* 1981;48:674.

“全国肝癌介入治疗研讨会”延期通知

本刊今年第一期第 22 页曾刊出“全国肝癌介入治疗研讨会”通知。现接主办单位通知会议延期到 1996 年上半年举行。会议地点、征文内容等不变,欲参加会议的医师请迳与上海医科大学附属中山医院联系,邮政编码 200032