

· 实验研究 Experiment research ·

聚 N-异丙基丙烯酰胺磁性阿霉素纳米微球 抗兔 VX2 肝肿瘤效果初步研究

李国平, 王小林, 龚高全, 王建华, 颜志平, 程洁敏, 瞿旭东, 高虹,
陈颐, 刘凌晓

【摘要】 目的 观察应用聚 N-异丙基丙烯酰胺磁性阿霉素纳米微球 (ADM-PNIPAM-Fe₃O₄) 对兔 VX2 肝肿瘤的动脉化疗栓塞治疗作用。方法 将肝脏已成功接种 VX2 肿瘤的新西兰大白兔随机分成 4 组, 每组 8 只。A 组为生理盐水对照组, 肝动脉灌注生理盐水 10 ml; B 组为游离阿霉素组, 肝动脉注入阿霉素 (1 mg/kg); C 组为 ADM-PNIPAM 组, 肝动脉注入 ADM-PNIPAM 1.5 mg/kg (约相当于阿霉素 1 mg/kg); D 组为 ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 并在瘤区外加磁场组, 肝动脉注入 ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 2 mg/kg (相当于阿霉素 1 mg/kg), 同时在肿瘤表面加磁场。4 组实验动物于介入术前 1 d, 术后 14 d 行 CT 肝脏及肺部扫描, 测量肿瘤大小, 检查肺部转移灶; 术后第 15 天处死, 全部实验动物均取肿瘤组织及肺脏作组织病理学检查, C 组及 D 组取胃、脾、肾器官行病理学检查。结果 术前 1 d 各组动物肿瘤体积无明显统计学差异。至术后 14 d 时, A 组平均肿瘤体积为 $(23.87 \pm 7.02) \text{ cm}^3$, B 组为 $(7.70 \pm 1.53) \text{ cm}^3$, C 组为 $(4.29 \pm 0.25) \text{ cm}^3$, D 组为 $(2.05 \pm 0.18) \text{ cm}^3$ 。B、C、D 3 组平均肿瘤体积均小于同期对照 A 组, B、C、D 3 组之间亦有差异, 按术后肿瘤体积从大到小的顺序排列依次为 B 组 > C 组 > D 组, 以 ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 并在瘤区外加磁场组最小。肺转移的发生率 A、B、C、D 组分别为 100%、66.7%、37.5%、12.5%, C、D 组肺转移率低于对照 A 组; 与 B 组相比 A 组转移率无明显统计学差异, 但病理学检查 B 组转移瘤数目比 A 组少; 肿瘤坏死程度为 D 组 > C 组 > B 组 > A 组。结论 经动脉途径应用 ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 联合外加磁场治疗对兔 VX2 肝肿瘤生长有较明显的抑制作用。初步肯定 ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 是一种有效的介入化疗栓塞制剂。

【关键词】 N-异丙基丙烯酰胺; 温度敏感; 阿霉素; 磁性纳米微球; VX2 肿瘤

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1008-794X(2007)03-0180-04

Preliminary study on therapeutic effect of poly (N-isopropylacrylamide) adriamycin magnetic nanoparticles via transarterial embolization on liver VX2 tumor in rabbits LI Guo-ping, WANG Xiao-lin, GONG Gao-quan, WANG Jian-hua, YAN Zhi-ping, CHEN Jie-min, QU Xu-dong, GAO Hong, CHEN Yi, LIU Lin-xiao. Department of Radiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective To evaluate the therapeutic effects of poly(N-isopropylacrylamide) adriamycin magnetic nanoparticles (ADM-PNIPAM-Fe₃O₄) on liver VX2 tumor in rabbits via transcatheter arterial chemoembolization. **Methods** VX2 tumor pieces were successfully implanted into liver lobes of rabbits with liver tumors formation. All the animals were randomly divided into 4 groups of 8 each. Group A (control group) injected with 10 ml physiologic saline, Group B (ADM group) treated with free adriamycin (1 mg/kg) via arterial infusion, Group C (ADM-PNIPAM group) ADM-PNIPAM (1.5 mg/kg) was infused through arterial route, Group D (ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ + M group) ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ (2 mg/kg) was infused through arterial route; all were in individual doses, respectively; meanwhile an persistent magnet with intensity of 0.4 T was stabilized at the tumor region. Spiral CT scans were performed to measure size of liver tumors and evaluate lung metastasis at 1 day before operation and 14 days after operation. All

基金项目: 上海市科委专项课题 (0452NM021)

作者单位: 200032 上海 复旦大学附属中山医院放射科

通讯作者: 王小林

experimental animals were sacrificed on the 15th days after operation and followed by pathologic and histologic examination of the tumor and lung specimens including changes before and after the operation with correlative comparisons. **Results** There were no significant difference in volumes of tumors among 4 groups at 1 day before operation. The average tumor volume in the group A was $(23.87 \pm 7.02) \text{ cm}^3$ at 14 days after operation; $(7.70 \pm 1.53) \text{ cm}^3$ in group B; $(4.29 \pm 0.25) \text{ cm}^3$ in group C; $(2.05 \pm 0.18) \text{ cm}^3$ in group D. The average tumor volumes in the group B, group C and group D were significantly smaller than that in the control group A at same time after operation and there was significant difference among the three experimental groups. According to the order of tumor sizes from small to large was as follows: group D < group C < group B < group A. It showed that the average size of group D (ADM-PNIPAM- Fe_3O_4 + M group) was the smallest among the 4 groups. Lung metastatic rates were 100%, 66.7%, 37.5% and 12.5% in group A, group B, group C and group D at 14 days after operation, respectively. Lung metastatic rates of group D was lower than that of group A, but there were no significant differences among group A, B and C. But pathological examination showed that there were lesser number of lung metastatic tumors in group B and C than that of group A. The intratumoral necrotic degrees showed as group D > group C > group B > group A. **Conclusions** ADM-PNIPAM- Fe_3O_4 treatment for liver tumor via vascular interventional method combined with magnetic field localized in the lesion possesses significant inhibitory effect on tumor growth of liver VX2 tumor in rabbits. ADM-PNIPAM- Fe_3O_4 is thus initially confirmed as a kind of effective preaputium in interventional chemoembolization. (J Intervent Radiol, 2007, 16: 180-183)

【Key words】 N-isopropylacrylamide ;PNIPAM ;Temperature-sensitive ;Adriamycin ;Magnetic nanoparticle ;VX2 tumor

带药的磁性纳米微球作为栓塞剂国内外已有不少研究。国内外已经用不同骨架成分(如白蛋白、脂质体等)^[1,2]包埋不同抗肿瘤药物制成了各种抗肿瘤磁性纳米微球。本实验所采用的聚 N-异丙基丙烯酰胺磁性阿霉素纳米微球 (ADM-PNIPAM- Fe_3O_4) 由于 PNIPAM 的温度敏感特性,适用于介入给药方法治疗肿瘤。我们采用 ADM-PNIPAM- Fe_3O_4 模拟人经动脉化疗栓塞 (TACE) 方法治疗兔肝脏 VX2 转移性肿瘤,研究其作为化疗栓塞药物新剂型的抗肿瘤效果及可行性。

1 材料与方法

1.1 实验设备与材料

① PHILIPS BV 300 型数字减影血管造影机 (DSA); ② Marconi MX 8000 型多排螺旋 CT 机; ③ 常用腹部外科手术器械及眼科手术器械; ④ 微导管及配套导丝 (3 F); ⑤ 钕铁硼永磁体 4 块 (每块大小: $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$, 表面磁场强度 0.4 T); ⑥ VX2 肿瘤细胞株从美国 ATCC 公司引进,在动物肝脏种植并传代保存; ⑦ 直径 $200 \sim 500 \text{ nm}$ 的 ADM-PNIPAM- Fe_3O_4 (每 2 mg ADM-PNIPAM- Fe_3O_4 含阿霉素 1 mg); ⑧ 直径 $200 \sim 500 \text{ nm}$ 的聚 N-异丙基丙烯酰胺阿霉素纳米微球 (ADM-PNIPAM) (每 1.5 mg ADM-PNIPAM 含阿霉素约 1 mg); ⑨ 纯化盐酸阿霉

素 (ADM); ⑩ CASIO-EX Z40 型数码相机; ⑪ Olympus BX41 型显微镜; ⑫ 麻醉药物: 氯胺酮 $0.1 \text{ g}/2 \text{ ml}$, 地西洋 $10 \text{ mg}/2 \text{ ml}$; ⑬ 肝素钠 ($12500 \text{ u}/\text{支}$) 0.1% 吐温 80 生理盐水, 2% 利多卡因; ⑭ 介入手术防护服。

1.2 实验方法

1.2.1 操作技术 采用新西兰大白兔,动物体重 $2.4 \sim 3.0 \text{ kg}$,雌雄不拘。将 32 只 VX2 肝肿瘤兔动物模型随机分成 A、B、C、D 4 组,每组 8 只,均在无菌条件下切开后腿根部皮肤暴露股动脉,经股动脉插入 3 F 微导管至兔肝动脉(超过胃肠道分支),在肝动脉造影显示肝内病灶后,尽量超选择插管至肿瘤分支, A 组(空白对照组)注入 0.1% 吐温 80 生理盐水 20 ml ; B 组(ADM 组)注入单纯游离阿霉素 ($1 \text{ mg}/\text{kg}$); C 组(ADM-PNIPAM 组)缓慢注入 ADM-PNIPAM $1.5 \text{ mg}/\text{kg}$ (相当于 ADM 含量约 $1 \text{ mg}/\text{kg}$); D 组(ADM-PNIPAM- Fe_3O_4 + M 组)缓慢注入 ADM-PNIPAM- Fe_3O_4 $2 \text{ mg}/\text{kg}$ (相当于 ADM 含量 $1 \text{ mg}/\text{kg}$),同时取上腹部正中剑突下切口,将兔肝脏充分暴露,将 0.4 T 钕铁硼永磁体垂直置于肿瘤所在肝叶表面,外用生理盐水纱布覆盖,在肿瘤表面外加磁场 30 min 后,取去磁场,仔细逐层缝扎切口,消毒。各组药物均用 0.1% 吐温 80 生理盐水 20 ml 分散,注射时间均为 10 min 。

1.2.2 评价标准 实验结果评价包括术前后肝脏肿瘤大小、肺转移与否、病理学观测肿瘤生长及坏死情况。检查时间:术前 1 d、术后 14 d 行 CT 扫描检测肝脏肿瘤灶,测量肿瘤体积(V),取 CT 扫描病灶最大层面,按公式 $V = 0.5 \times a \times b$ 计算,其中 a 为瘤灶长径 b 为与 a 相垂直的短径;术前 1 d、术后 14 d 同时进行胸部 CT 扫描,观察两肺肿瘤转移情况。并在术后 15 d 处死动物立即检查肝内肿瘤大小,腹部、肺部转移情况,取肝脏病灶、肺进行病理学检查,并取 C 组及 D 组部分动物胃、脾、肾行病理学检查,病理学检查包括 HE 染色及普鲁士铁染色。对计量资料作 t 检验或方差分析,对计数资料进行卡方检验,样本量小的作精确检验。全部资料采用 Stata 7.0 版统计软件分析,定 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术前后肿瘤大小改变

各组术前及术后 1、14 d 测得肿瘤大小见表 1。

表 1 4 组实验动物平均肿瘤体积变化($\bar{x} \pm s$) cm^3

组别(n)	术前 1 d	术后 14 d
A(8)	1.08 ± 0.19	23.87 ± 7.02
B(8)	1.00 ± 0.08	7.70 ± 1.53
C(8)	1.04 ± 0.03	4.29 ± 0.25
D(8)	1.06 ± 0.09	2.05 ± 0.18

注:1. 术前各组肿瘤平均体积比较差异无显著性 $P > 0.05$ 2. 术后 B、C、D 组与对照组(A 组)比较差异显著 $P < 0.05$ 3. 术后 14 d B、C、D 组每组两两比较差异显著 $P < 0.05$

2.2 肺部转移情况

各组实验动物在术前 1 d 行 CT 检查均无肺部转移。术后 14 d 再进行胸部 CT 扫描,观察两肺情况。在 CT 扫描图像中肺转移瘤表现为分布于两中下肺野中外带圆形小结节病灶,多发且形态规则,边缘较光整,密度均匀。本实验中各组实验动物肺转移情况见表 2。将各试验组和对照组以及各试验组两两之间采用四格表精确检验法进行比较,结果显示,B 组肺转移率和 A 组相比无明显统计学差异($P > 0.05$),但 C、D 组和 A 组相比有统计学差异($P < 0.05$)。B、C 试验组之间在肿瘤肺转移上差异无统计学意义($P > 0.05$),从病理解剖结果可以看到 A 组肺内转移瘤结节数目呈弥漫分布于两肺,具体转移瘤数目难以计数,B、C、D 组虽然存在肺转移,但肺转移瘤肺内密集程度相比 A 组明显减少,大体病理见白色结节弥漫分布于两侧肺叶表面,结节直径多在 0.5 ~ 1 cm。其中 D 组 1 例肺转移结节数目最少,还发现 A 组 1 例存在双肾转移,B 组发

现 1 例胸壁转移。

表 2 4 组实验动物肺转移情况

组别	实验动物数	肺转移动物数	转移率	P 值
A	8	8	8/8	
B	8	6	6/8	> 0.05
C	8	3	3/8	< 0.05
D	8	1	1/8	< 0.05

P 值各组与 A 组相比

2.3 病理表现

A 组 VX2 肝肿瘤外观呈鱼肉状,呈圆形,生长良好,部分见囊性变,中央坏死不明显,肿块明显大于其他组,向肝叶表面突出,与周围器官组织粘连,3 只动物腹壁可见转移肿块,其中 1 只腹部转移肿块巨大,呈多个大小不等葡萄串样。B 组肿块略小于 A 组,而 C 组和 D 组体积相对较小。B、C、D 组肿瘤内部均可见坏死,尤其以 D 组坏死最为明显,并且肿瘤周围形成一圈较厚的结缔组织包膜。镜下可见 A 组和 B 组动物肿瘤组织生长良好,少量坏死,C 组肿瘤组织散在片状坏死,肿瘤体内见部分淋巴细胞浸润。D 组肿瘤细胞绝大部分坏死,肿瘤表面为纤维组织,内部见无结构的坏死组织。在普鲁士铁染色切片中,可见 A、B、C 组血管内及肿瘤组织内均无明显铁沉积,D 组在肿瘤内及在肿瘤周围血管内和组织中均可见到黑色铁颗粒沉积。C 组及 D 组所取动物的胃、脾、肺、肾均未见异位栓塞表现。

3 讨论

TACE 已被公认为除外科手术外首选的靶向治疗肝肿瘤的方法。目前临床上还是以碘油作为最常用的末梢栓塞剂。但碘油易造成正常组织的异位栓塞,可加重肝硬化并发生术后并发症^[3-5]。研究能精确到达肿瘤末梢血管部位的带药栓塞剂成为介入医学的另一大发展方向。

磁性微球、微粒的出现为解决药物能更精确地到达靶部位这一问题提供了新的途径。粒径为纳米级的磁性药物微粒是近年来研究和发展的—种新型靶向给药系统,其靶向作用原理,是将药物和适量具磁活性成分配制于药物稳定系统中,在一定强度的外磁场下经动脉注入到靶部位,由于外加磁场作用,磁性药物纳米微粒逐渐定位于靶部位,使其所含药物得以定位释放,集中在病变部位发挥作用,达到高效、低毒的治疗目的,这种纳米微粒中结合抗肿瘤药物,在肿瘤的靶向给药方面有极大好处,结合介入治疗技术,可以达到超选择靶向治疗的效果^[6]。

温度敏感性水凝胶是一种新型智能材料,尽管只有 20 多年的研究史,但其潜在的应用价值已吸引了国内外众多的研究者。其分为低温收缩型和高温收缩型 2 种,前者在某一温度附近随温度升高水凝胶体积发生突变式增加,当温度降低时,其体积又缩小;高温收缩型的温度敏感性水凝胶的代表是以 PNIPAM 为基础的均聚物或共聚物。

PNIPAM 为其单体 N-异丙基丙烯酰胺 (NIPAM) 的聚合物,由于其大分子侧链上同时具有亲水性的酰胺基-CONH-和疏水性的异丙基-CH(CH₃)₂-,使线型 PNIPAM 水溶液及交联后的 PNIPAM 水凝胶呈现出温度敏感特性。其表现为在常温(25℃)以下,线性 PNIPAM 溶于水形成均匀溶液,当水溶液温度升高至 30~35℃ 之间的某一温度时(因合成方法、合成条件等而异),溶液发生相变,表现出较低临界溶解温度(lower critical solution temperature,简称 LCST),即 PNIPAM 水凝胶在常温(25℃)下呈溶胀状态,当其温度升高至相变点温度约 32℃ 附近时,在温度变化数摄氏度就可以引发数倍甚至数十倍的体积收缩变化^[7-9]。

由于 PNIPAM 对温度改变的响应性非常高,并且其 LCST 在 32℃ 左右,在 PNIPAM 中加入不同比例的交联剂时,LCST 可以相应上移或下降。当带药 PNIPAM 被注射入 37℃ 左右的人体血管内时,体积会迅速变小,内载药物将以挤压方式迅速释放;在实际运用 PNIPAM 作为磁性纳米药物载体时,应该设法控制其体积变化速度及程度,使其 LCST 在 37℃ 左右,而且能缓慢收缩持续释放药物。用交联剂与线性 PNIPAM 交联后能很好的解决这个问题,即在 PNIPAM 中加入不同比例的交联剂时,使 LCST 相应上移。我们采用的 ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 中已加入 MBA 作为交联剂,与 PNIPAM 的交联率约为 10%,其在 20~50℃ 水溶液内,随着温度升高,体积收缩,动态光散射下观察其水凝胶的粒径在 200~500 nm 之间,并可在 42℃ 左右大量释放 ADM。正常人体肝脏温度为 38℃ 左右,富血供的肝癌组织内温度与肝脏温度相仿,将 LCST 为 42℃ 左右的纳米微球 ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 引入至肿瘤血管内,利用 PNIPAM 的温度敏感特性,可在肿瘤血管内引起部分体积收缩,并以挤压方式释放药物,形成肿瘤内局部高浓度化疗药,提高治疗肿瘤的效果。在我们的实验中,C 组为单纯动脉注入 ADM-PNIPAM 组,肿瘤增大程度比 B 组(单纯灌注 ADM 组)小,可说明 PNIPAM 的温度敏感特性有助于局部高浓度

化疗药形成,使抗肿瘤作用增强,相比单纯灌注 ADM 抗肿瘤疗效好。如果能在加入磁场同时结合肿瘤局部升温至 42℃ 左右,将可能达到更大的释药效果。

从实验结果可以看出,用介入方法经肝动脉注入 ADM-PNIPAM-Fe₃O₄,肿瘤区外加磁场组(D 组)动物肿瘤生长最为缓慢,平均肿瘤体积明显小于其他各实验组。术后 14 d 检测各组实验动物肺转移亦发现 D 组仅 1 只动物有肺转移,发生率明显低于其他各组。D 组肺转移者转移瘤的数目也明显少于其他组,其中对照组 A 组肺转移瘤数目最多,可见单纯灌注化疗药对肿瘤治疗效果不如化疗加栓塞。ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 进入肿瘤体内后,由于栓塞及化疗并行,肿瘤较快得到控制,减少了转移。

本实验研究初步表明,经介入途径肝动脉灌注温度敏感性 ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 同时在肿瘤区加磁场治疗肝脏肿瘤的方法可行,对兔 VX2 肝移植性肿瘤生长有较好的抑制作用,且未出现异位栓塞症状及相关组织学发现。随着今后对其临床药理学、药动力学等的深入研究和完善,ADM-PNIPAM-Fe₃O₄ 将有可能成为实体瘤的一种新型化疗栓塞剂。

[参考文献]

- [1] 王小林,林根来,龚高全,等.阿霉素磁性白蛋白纳米微粒介入治疗兔 VX2 肝肿瘤[J].复旦学报(医学版),2004,31:383-386.
- [2] 周平红,姚礼庆,秦新裕,等.磁性阿霉素纳米脂质体的研制及其磁靶向定位研究[J].中华实验外科杂志,2004,21:492.
- [3] Chung JW, Park JH, Han JK, et al. Hepatic tumors: predisposing factors for complications of transcatheter oily chemoembolization[J]. Radiology, 1996, 198:33-40.
- [4] 王建华,王小林,颜志平,等.腹部介入放射学[M].上海医科大学出版社,1998.55-61.
- [5] Coldwell DW, Tokes KR, Yakes WF. Embolotherapy: agents, clinical applications, and techniques[J]. Radiographics, 1994, 14:623-643.
- [6] Häfeli UO, Schütt W, Teller J, et al. Scientific and clinical applications of magnetic carriers [M]. New York/London: Plenum, 1997.
- [7] Kim SW, Bae YH, Kano TO. Hydrogels Swelling, drug loading and release[J]. Pharm Res, 1992, 9:283-290.
- [8] Schield HG, Poly(N-isopropylacrylamide): experiment theory and application[J]. Prog Polym Sci, 1992, 17:163-249.
- [9] Kost J, Langer R. Responsive polymeric delivery systems [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 46:125-148.

(收稿日期 2006-12-18)