

· 实验研究 Experiment research ·

介入导入三氧化二砷微球对 VX2 兔肝肿瘤模型的治疗作用

瞿旭东, 王建华, 颜志平, 程洁敏, 李国平, 刘 嵘, 钱 晟

【摘要】 目的 观察介入导入三氧化二砷(As_2O_3)微球对 VX2 兔肝肿瘤模型的治疗作用。方法 新西兰大白兔 32 只,体重 2.3 ~ 2.8 kg,制作 VX2 兔肝肿瘤模型并随机分成 4 组,每组 8 只,均经右侧股动脉插管至肝动脉,向肿瘤供血动脉给药:a 组动脉灌注组: As_2O_3 3 mg/kg + 生理盐水 10 ml;b 组 As_2O_3 微球栓塞组:注入 As_2O_3 PLGA 微球 3 mg/kg;c 组空白微球栓塞组:注入 PLGA 微球 3 mg/kg;d 组为对照组:经肝动脉注入生理盐水 10 ml。兔肝肿瘤模型制作后 14 d 行肝螺旋 CT 双期动态扫描,根据螺旋 CT 扫描获得肝内肿瘤影像,测量肿瘤大小,次日行介入治疗,术后第 21 天处死实验兔后,取出肝脏,测量瘤体大小;肿瘤组织 4%甲醛固定,多点取材,HE 染色,显微镜检。结果 实验兔介入操作均获成功,且均存活。肿瘤平扫呈低密度,与周围正常肝实质分界欠清。增强后动脉期肿瘤强化明显,坏死组织无强化,呈不均匀高密度,肿瘤与周围肝实质分界清楚。门脉期肿瘤呈不均匀低密度,而周围正常肝实质强化明显,术后 CT 随访 d 组和 a 组肿瘤明显增大,中央呈低密度;c 组肿瘤有轻度强化,b 组肿瘤体积小,呈低密度,边界清楚,强化不明显。各组肿瘤体积术前无统计学差异,术后标本体积测量显示 As_2O_3 微球栓塞组瘤体最小,a、b、c 组与 d 组间有显著统计学差异($P < 0.05$),b 组与 c 组、a 组间有显著统计学差异($P < 0.05$)。病理检查显示 a 组和 d 组肿瘤体积大,呈鱼肉样,质地脆,坏死区位于肿瘤中心区域,白色豆渣样,肿瘤血管丰富,显微镜下肿瘤细胞丰富,巢团状排列,纤维样组织少与正常肝组织分界不清,呈浸润性生长。b 组肿瘤体积小,坏死明显,坏死区边缘纤维组织丰富,在纤维组织内可见残存瘤巢。在纤维组织外围见到肝细胞空泡变性,呈片状分布。结论 As_2O_3 PLGA 微球对 VX2 兔肝肿瘤有良好的化疗栓塞效果,使用安全。

【关键词】 肝细胞肝癌;三氧化二砷;微球;VX2 兔

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1008-794X(2007)03-0184-05

The treatment effect of As_2O_3 -PLGA microspheres on VX2 rabbits liver tumor models QU Xu-dong, WANG Jian-hua, YAN Zhi-ping, CHEN Jie-min, LI Guo-ping, LIU Rong, QIAN Cheng. Department Radiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 **Objective** To assess the treatment effects of As_2O_3 -PLGA microspheres on VX2 rabbits liver tumor models. **Methods** Thirty-two New Zealand white rabbits were involved with formation of VX2 rabbits liver tumor models, and randomly divided into 4 groups of 8 each: (a) As_2O_3 plus 0.9% NaCl solution group: 3 F co-catheter was plugged into hepatic artery, and then As_2O_3 (3 mg/kg) plus 10 ml 0.9% NaCl solution was injected into the tumor through the feeding artery; (b) As_2O_3 -PLGA microspheres group: As_2O_3 -PLGA microspheres (3 mg/kg) was injected into the tumor through the feeding artery; (c) PLGA microspheres group: Injection of PLGA microspheres (3 mg/kg) injected into the tumor through the feeding artery; (d) control group: 0.9% NaCl solution (10 ml) was injected into the feeding artery. Dual phase helical CT scans were performed the day before treatment, 20 days after treatment and finally the rabbits were sacrificed. The sizes of the tumor were measured and followed by histopathological analysis and HE staining. **Results** The volumes of tumors post operatively of group a, b, c and d were $(31.08 \pm 11.15) \text{ cm}^3$, $(3.82 \pm 2.537) \text{ cm}^3$, $(13.22 \pm 4.665) \text{ cm}^3$ and $(115.8 \pm 62.01) \text{ cm}^3$ respectively. The most significant treatment effect was available in group b, with more coagulation necrosis and fibrotic tissue formation. Statistical analysis indicated

that the treatment effects of group a, b, c were better than that of group d with significant difference which can be also seen between group a and b, group b and c. **Conclusion** As_2O_3 -PLGA microspheres shows rather excellent chemoembolization effects on VX2 rabbit liver tumor model with safely. (J Intervent Radiol, 2007, 16: 184-188)

【Key words】 Arsenic trioxide; PLGA; Microspheres; Interventional radiology; Hepatocellular carcinoma

目前,对原发性肝癌等富血供肝脏肿瘤的介入治疗,以化疗性栓塞是主要手段^[1-5]。我们构建了三氧化二砷(As_2O_3)PLGA 生物可降解微球,希望一方面能栓塞肿瘤供血血管,切断肿瘤供养,一方面使药物缓释,增强药物治疗效果,减轻 As_2O_3 毒性反应。我们通过建立 VX2 兔肝肿瘤模型,运用介入放射学方法将 As_2O_3 微球导入肿瘤组织,对其疗效进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 新西兰大白兔,体重 2.3 ~ 2.8 kg,雌性,由复旦大学枫林校区实验动物部提供。动物合格证标号 01649。

1.1.2 器械与药物

1.1.2.1 外科常用腹部手术包及显微外科手术器械。

1.1.2.2 盐酸氯胺酮注射液,上海中西药业股份有限公司产品,批号 001001;地西洋注射液,上海旭东海普药业有限公司产品,批号 981202。

1.1.2.3 As_2O_3 为 Sigma 公司产品。

1.1.2.4 As_2O_3 PLGA 微球及空白 PLGA 微球按相同处方生产。

1.1.2.5 3 F SP 微导管 Terumo 公司产品。

1.2 VX2 兔肝肿瘤模型制作

VX2 肿瘤经新西兰大白兔大腿内侧皮下种植传代,取肿瘤已长到 3 ~ 4 cm 直径的种兔,氯胺酮与地西洋按 2 : 1 体积配比,每只兔 5 ~ 6 ml 麻醉后固定,消毒铺巾,将肿块整体剥离取出,剔除筋膜及坏死组织,生理盐水漂洗,切取鱼肉样肿瘤组织数块放入小烧杯中,加入少量生理盐水,眼科剪反复剪切使肿瘤组织块成细小颗粒状,注射器抽吸备用。

经耳缘静脉将兔麻醉后,仰卧位固定于兔台,常规腹部脱毛、消毒、铺巾,取腹正中切口,进腹后轻轻拉出肝脏,将含有 VX2 瘤块悬液 0.1 ml 注入肝实质内,用胶海绵压迫创面后将肝脏送回腹腔,关腹。

1.3 实验分组

新西兰大白兔 32 只,随机分成 4 组,每组 8 只。均经右侧股动脉插管至肝动脉,向肿瘤供血动脉给

药 a 组动脉灌注组: As_2O_3 3 mg/kg + 生理盐水 10 ml; b 组 As_2O_3 微球栓塞组: 注入 As_2O_3 PLGA 微球 3 mg/kg; c 组空白微球栓塞组: 注入 PLGA 微球 3 mg/kg; d 组对照组: 经肝动脉注入生理盐水 10 ml。

1.4 介入操作及实验观察

兔肝肿瘤模型制作后 14 d 行肝螺旋 CT 双期动态扫描,本实验采用 GE Hispeed Adv 螺旋 CT 机扫描。将实验兔全麻后固定在扫描床上,先行肝脏平扫,再行肝脏动脉期和门静脉期增强扫描。增强扫描采用高压团注方式(对比剂 Ultravist 300 mgI/ml),每只兔注射总量 9 ml,注射速率 0.3 ml/s,动脉期增强延迟时间 10 ~ 11 s,门静脉期增强扫描延迟 45 ~ 50 s。螺旋 CT 其他参数为管电压 120 kV、管电流 200 mA、SFOV Small、DFOV 14.0 cm、层厚 3 mm、层间距 3 mm、Pitch 1 : 1。根据螺旋 CT 扫描获得肝内肿瘤影像,分别测量肿瘤最长径(a)和与之垂直的短径(b),次日行介入操作,具体操作为:经耳缘静脉将兔麻醉后,仰卧位固定于兔台,常规右侧股动脉切口区脱毛、消毒、铺巾,分离股动脉,切开后经微导丝引入 3 F 导管,插管至腹腔干造影明确肿瘤供血动脉,超选择至肿瘤供血动脉,注入药物后拔管。部分实验兔术后 20 d 进行肝脏螺旋 CT 双期动态扫描,第 21 天处死实验兔后,取肝脏 4% 甲醛固定。病理取材时取横断位,首先在与躯干纵轴垂直的最大平面切开瘤体,测量瘤体最大直径(a)以及与 a 垂直的直径(b);多点切取肿瘤组织,石蜡包埋,病理切片 HE 染色,显微镜检查。肿瘤体积(v) = $0.5 ab^2$ 。

1.5 统计方法

SPSS 统计软件分析,实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计学方法用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 实验操作及兔治疗后一般情况

实验兔股动脉切开插管均获成功,在导丝引导下导管插至肝总动脉造影,造影显示肿瘤血管丰富,染色明显,供血动脉增粗,但肿瘤染色特点与临床所见原发性肝癌有所区别,为边缘性环状染色,

动静脉瘘不明显。所有实验兔均成功插管至肝固有动脉,但在超选至供血动脉过程中部分实验兔发生血管痉挛,我们考虑由于兔肝动脉细小,插管后血管壁受到导管刺激,诱发痉挛,这时需稍稍撤出导管,注入 20 mg 利多卡因,待 5 min 后再行介入操作。术中轻柔操作,减少对血管壁刺激是减少痉挛发生的关键。在注入 As_2O_3 微球时用 0.9% 生理盐水:对比剂体积比为 1:1 的溶液 3 ml 加入微球,5 ml 注射器反复抽吸制成混悬液透视下缓慢注入。操作过程中感到微球经导管注入阻力小,注入速度容易控制,缓慢注射时不容易发生反流。栓塞后可见对比剂在瘤区滞留。

实验兔均存活。生理盐水组和 As_2O_3 灌注组术后第 2 天就能正常进食,精神状态良好。微球组术后食欲减退,精神较萎靡,1~2 d 后即逐渐恢复正常。未见气促、惊厥症状。

2.2 实验兔 CT 扫描所见

实验兔均获满意肿瘤 CT 图像。肿瘤平扫呈低密度,与周围正常肝实质分界欠清。动脉期增强后肿瘤强化明显,坏死组织无强化,呈不均匀高密度,肿瘤与周围肝实质分界清楚。门脉期肿瘤呈不均匀低密度,而周围正常肝实质强化明显(图 1、2)。术后 CT 随访生理盐水组和 As_2O_3 灌注组肿瘤明显增大,中央坏死明显;空白微球栓塞组肿瘤有轻度强化, As_2O_3 微球栓塞组治疗后肿瘤体积缩小,呈低密度,

边界清楚,强化不明显(3)。

2.3 各治疗组肿瘤体积比较

各组 VX2 兔术前及术后肿瘤体积见表 1。经 SPSS 10.0 统计软件分析,a、b、c 组与 d 组间有显著统计学差异($P < 0.05$);b 组与 c 组、a 组间有显著统计学差异($P < 0.05$)。说明 As_2O_3 对 VX2 兔肝脏肿瘤有治疗意义,PLGA 微球对肿瘤有栓塞作用; As_2O_3 微球组疗效优于单纯灌注及空白微球栓塞。

表 1 各组 VX2 兔治疗前后肿瘤体积

组别	术前体积(cm^3)	术后体积(cm^3)
a. 动脉灌注组	2.181 ± 1.175	31.08 ± 11.15
b. As_2O_3 PLGA 微球栓塞组	2.097 ± 1.134	3.82 ± 2.537
c. PLGA 空白微球组	2.027 ± 0.87	13.22 ± 4.665
d. 对照组	2.123 ± 1.183	115.8 ± 62.01

2.4 病理组织学观察

病理检查显示 As_2O_3 灌注组和对照组肿瘤大,呈鱼肉样,质地脆,坏死区位于肿瘤中心区域,有不完全索条状肿瘤组织分隔,肿瘤血管丰富;显微镜下肿瘤细胞丰富,巢团状排列,纤维样组织少,与正常肝组织分界不清,浸润性生长,肿瘤细胞体积大,胞质丰富,核大,核异形明显。 As_2O_3 PLGA 微球组栓塞后肿瘤体积较小,坏死明显,坏死区边缘纤维组织丰富,在纤维组织内可见残存瘤巢,在纤维结构外围见肝细胞空泡变性,呈条片状分布。空白微球组坏死区周围纤维样结构较少,残存肿瘤组织较多(图 4~7)。

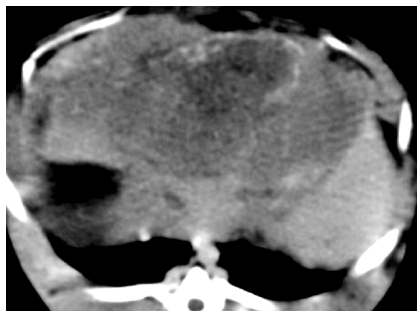


图 1 对照组 VX2 兔肝脏肿瘤巨大,平扫呈低密度,伴有出血

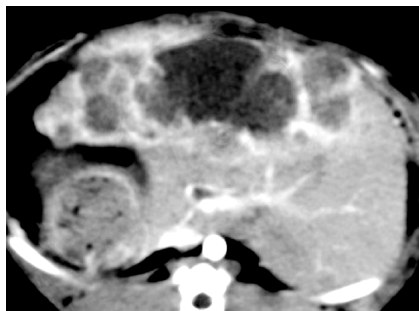


图 2 增强动脉期血供丰富,分隔状强化,坏死区低密度

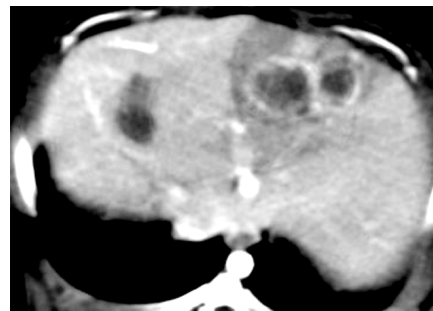


图 3 PLGA 微球栓塞组 6 号兔,术后栓塞区域呈低密度三角形,病灶仍有强化,但不明显

3 讨论

VX2 兔肝肿瘤动脉血供丰富,具有与人肝脏富血供肿瘤类似的血供特点^[6-11]。肝内接种肿瘤后 4 ~ 5 周多出现双肺转移,恶性征象明显。肿瘤平扫呈低密度,与周围正常肝实质分界欠清。动脉期增强后肿瘤强化明显,坏死组织无强化,呈不均匀高密度,肿瘤与周围肝实质分界清楚。门脉期肿瘤呈不均匀低密度,而周围正常肝实质强化明显。术后 CT 随访生理盐水组和 As_2O_3 灌注组肿瘤明显增大,中央呈低密度;空白微球栓塞组肿瘤有轻度强化, As_2O_3 PLGA 微球栓塞组肿瘤体积小,呈低密度,边界清楚,无强化。

VX2 兔肝肿瘤模型可在 DSA 下进行介入放射学操作。选择 3 F 微导管、熟练的介入操作技术是保证插管成功的关键,经导管将药物导入 VX2 肿瘤组织是可行的。在本组实验中我们采用切开右侧股动脉,引入导管的方法在 DSA 下行超选择插管。仰卧位时,兔的腹腔动脉从脊柱胸腰段右侧缘向右上方发出,腹腔动脉分出胃十二指肠动脉、胃左动脉和肝总动脉。兔胃体积相对较大,胃十二指肠动脉和胃左动脉较粗,而肝总动脉相对较小,向上方走行,分出左右肝动脉。兔肝略呈倒三角形,左叶大于右叶。3 F 微导管可以顺利地插到肝左或肝右动脉。

As_2O_3 有良好的诱导肝癌细胞凋亡作用,但由于 As_2O_3 较强的毒性以及肝癌的生物学特性, As_2O_3 经传统静脉途径给药治疗肝癌并不合适。经介入途径给药具有良好的靶向性,局部药物浓度高,全身不良反应少等优点,因此我们构建了适于介入途径投送的 As_2O_3 PLGA 微球。这种微球外形光整,分散性及流动性好,平均载药量 $14.6\% \pm 0.3\%$,手术中加入对比剂制成混悬液用 5 ml 注射器经微导管推注时阻力小,推注速度易控制,不易反流。微球栓塞组实验兔术后全部存活,术后全身状况恢复良好,提示这种微球介入栓塞安全性好。

人体微动脉直径一般在 100 μm 以下,正常肝脏的终末小动脉内径为 20 ~ 50 μm ,肝窦为 7 ~ 15 μm ,毛细血管宽 1 ~ 8 μm ^[12],我们构建的微球粒径在 20 ~ 100 μm ,占 91.5%,适于肝动脉栓塞。与大粒径栓塞剂相比,小粒径栓塞剂能闭塞肿瘤末梢血管,彻底封闭肿瘤血供,减少侧支血供形成。在微球选择性栓塞不同管径血管过程中,微球的分散性和流动性对栓塞部位的影响也很大,分散性和流动性差的微球容易聚集成团,造成血管主干栓塞,引起

大面积梗死。我们制作的微球分散性和流动性好,与对比剂混合后微球悬浮状况好,沉降速度较慢,能满足推注需要。以 PLGA 作为 As_2O_3 的载体能在体内降解,一方面使药物缓释提高了药物作用效果,另一方面有助于瘤周正常肝组织或异位栓塞区血液的再获取,提高了栓塞安全性。

本组资料显示 a 组与 b 组和 c 组间存在显著性差异,而 b 组肿瘤体积最小,表明 As_2O_3 PLGA 微球具有良好的化疗栓塞作用,优于单独 As_2O_3 灌注和单纯 PLGA 微球栓塞治疗。我们在一系列实验中观察到 As_2O_3 能诱导肝癌 7721 细胞株凋亡,降低 MHCC97H 细胞的侵袭性,抗 LCID 20 高转移裸鼠肝癌模型血管生成,抑制 PIEC(猪肠动脉内皮细胞)生长,诱导其凋亡,说明 As_2O_3 微球对肝癌的治疗效果是包括微球栓塞在内的多途径作用结果。镜下微球组坏死区边缘纤维组织丰富,在纤维组织周围的肝组织空泡样变性明显,提示我们微球栓塞的血管位置较靠近近端,部分肿瘤旁肝组织也发生缺血性改变,有肝段性栓塞作用。

因此,我们认为 As_2O_3 PLGA 微球对 VX2 兔肝脏肿瘤有良好的化疗性栓塞作用,并且微球流动分散性好,适于介入靶向性投送,使用安全,微球导入瘤体内能够做到:①栓塞肿瘤供血动脉;② As_2O_3 在瘤体局部滞留缓释,有助于保持局部药物浓度;③PLGA 体内降解,有利于重复给药,并有助于瘤周正常组织血供重新获得。

[参考文献]

- [1] 王建华,林贵,顾正明,等.肝动脉化疗栓塞术中晚期肝癌[J].中华肿瘤杂志,1992,14:276-277.
- [2] Fan J, Ten GJ, He SC, et al. Arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 1998, 4: 33-37.
- [3] Ebied OM, Federle MP, Carr BI, et al. Evaluation of responses to chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2003, 97: 1042-1050.
- [4] Ramsey DE, Kernagis LY, Soulen MC, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma[J]. J Vasc Interv Radiol, 2002, 13: S211-S221.
- [5] Okada M, Kudo S, Miyazaki O, et al. Antitumoral efficacy and pharmacokinetic properties of pirarubicin upon hepatic intra-arterial injection in the rabbit VX2 tumor model[J]. Br J Cancer, 1995, 71: 518-524.
- [6] Mugitani T, Taniguchi H, Takada A, et al. TNP-470 inhibits collateralization to complement the anti-tumor effect of hepatic artery ligation[J]. Br J Cancer, 1998, 77: 638-642.

- [7] Rous P, Kidd JG, Smith WE. Experiments on the cause of the rabbit carcinomas derived from virus-induced papillomas. II. Loss by the Vx2 carcinoma of the power to immunize hosts against the papilloma virus[J]. J Exp Med, 1952, 96:159-174.
- [8] Boehm T, Malich A, Goldberg SN, et al. Radio-frequency tumor ablation: internally cooled electrode versus saline-enhanced technique in an aggressive rabbit tumor model[J]. Radiology, 2002, 222:805-813.
- [9] Tabaru K, Konno T, Oda T, et al. Treatment of VX2 carcinoma implanted in the liver with arterial and intraperitoneal administration of oily anticancer agents[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 47:149-154.
- [10] Hamuro M, Nakamura K, Sakai Y, et al. New oily agents for targeting chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 1999, 22:130-134.
- [11] 邵国良, 周康荣, 王建华, 等. 介入治疗实验研究中兔 VX2 肝癌模型制作的改进和 CT 评价[J]. 临床放射学杂志, 2000, 19:653-655.
- [12] 田牛, 刘育英, 李向红, 等主编. 肝微循环的特点及疾病时的改变: 微循环的临床与基础[M]. 北京: 原子能出版社, 1996:99.

(收稿日期 2006-12-18)

· 消 息 ·

2007' 全国介入新技术学术大会暨第二届苏皖介入放射学年会通知

由中华医学会苏皖两省介入放射学组、中国抗癌协会江苏省肿瘤介入治疗委员会、南京军区总医院、江苏省人民医院、南京市第一医院、江苏省肿瘤医院联合主办的“2007' 全国介入新技术学术大会”将于 2007 年 4 月 5~8 日在风景秀丽的古都南京举行。

本次会议将涉及血管病介入治疗、肿瘤介入治疗、血管性介入治疗等方面的议题,着重研讨当前介入新技术的临床应用、新形势下介入放射学发展等热门话题。会议将突出强调“研讨”的作用,努力营造“百家争鸣、畅所欲言”的学术氛围。我们将邀请国内知名专家莅临会议作专题讲座,而且我们也希望与会代表积极参与大会学术交流。为此我们向您发出征文通知,期待您在百忙之中将您的学术观点、宝贵经验形成文字,并与我们共同分享。

本期会议也是国家级医学继续教育学习班(“血管性疾病介入治疗新技术”,项目编号 2007-09-01-043(国)I 类学分 12 分;“周围血管病介入诊疗新技术”,项目编号 2007-09-04-004(国)I 类学分 10 分),与会代表将授予 I 类学分 22 分。

热烈欢迎介入放射科医师及热衷于介入技术的各科临床医师、技师及护士参加本次会议!

征文范围:

- 1、血管性疾病与肿瘤介入治疗
- 2、非血管介入治疗
- 3、介入诊治相关并发症
- 4、介入新器械、新方法的实验研究、基础研究及临床应用
- 5、介入病房管理
- 6、介入护理方法、经验体会和教训

稿件格式:

- 1、论著需全文及 800 字以内的标准论文摘要,包括目的、方法、结果与结论四要素。
- 2、经验交流短篇报道与综述等限 1000 字以内。
- 3、稿件要求 Word 格式 Email 投稿。邮寄者须 Word 格式打印稿,附软盘。
- 4、来稿请标明题目、作者姓名、单位、详细地址、邮编、Email 地址、联系电话,请自留底稿,恕不退稿。
- 5、征文截止日期为 2007 年 3 月 15 日。
- 6、经大会专家组审稿后推荐做大会专题发言交流的稿件,会务组将在 3 月 25 日前通知您大会交流的具体事项,请您做好准备。
- 7、来稿请寄:

Email: cjr.gujianping@vip.163.com

地址:江苏省南京市长乐路 68 号 南京市第一医院 介入科

邮政编码:210006

2007' 全国介入新技术学术大会会务组

2007 年 2 月