

• 实验研究 Experimental research •

经眼动脉灌注治疗兔成视网膜细胞瘤

张 靖, 姜 华, 陈昆山, 李海波, 蒋贻洲, 林雀卿, 李 丹,
黄晓明, 肖湘生

【摘要】 目的 评估兔成视网膜细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 模型的建立及经导管眼动脉灌注 (selective ophthalmic arterial injection, SOAI) 治疗兔 RB 的可行性。**方法** HXO-Rb44RB 细胞予中心细胞室培养, 取对数生长期 HXO-Rb44 细胞, 用 PBS 配成浓度为 2.0×10^7 个/ml 的细胞悬液, 抽取 0.1 ml 细胞悬液注射于 6 只 SPF 级新西兰兔右眼视网膜间隙下。接种肿瘤细胞前 3 d 和注射后 1 个月臀部注射环孢素 A $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 1 个月后减量至 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 并持续到实验结束。将 RB 兔分为对照组 3 只和实验组 3 只, 对照组灌注 0.9% 氯化钠溶液 15 ml, 实验组将美法仑 2.5 mg 用 0.9% 氯化钠溶液稀释至 15 ml 后灌注。术后分别于 7、14 d 比较两组肿瘤生长情况。**结果** 注射环孢素 A 期间, 实验兔不良反应轻微, 6 只均建模成功。7 次插管中 6 次成功插至眼动脉。SOAI 术后 1 周, 实验组肿瘤可见明显缩小, 2 周后均消失。SOAI 术后, 实验组仅 1 只见右眼轻度红肿、流泪, 1 周后红肿自行消退。**结论** SOAI 治疗 RB 兔具有可行性, 为进一步经眼动脉灌注治疗 RB 的基础研究提供了参考。

【关键词】 成视网膜细胞瘤; 动物模型; 经眼动脉灌注术; 美法仑

中图分类号: R774.1; R739.72 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2015)-02-0146-04

Selective ophthalmic arterial perfusion of melphalan for retinoblastoma: an experimental study in rabbits ZHANG Jing, JIANG Hua, CHEN Kun-shan, LI Hai-bo, JIANG Yi-zhou, LIN Que-qing, LI Dan, HUANG Xiao-ming, XIAO Xiang-sheng. Department of Radiology, Affiliated Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Corresponding author: XIAO Xiang-sheng, E-mail: cjr.xiaoxiangsheng@vip.163.com

【Abstract】 Objective To investigate the establishment of retinoblastoma model in experimental rabbits, and to evaluate the feasibility and success rate of selective ophthalmic arterial perfusion of melphalan in treating retinoblastoma in experimental rabbits. **Methods** The human retinoblastoma HXO-Rb-44 cell line was cultured in the cell culture chamber with modified RPMI 1 640 medium containing 10% fetal bovine serum. The cell concentration in the suspension was 2.0×10^7 cells/ml. The cell suspension of 0.1 ml was injected in the retinal gap of the right eye in six New Zealand rabbits. The rabbits were immuno-suppressed with daily intramuscular injection of cyclosporin A so as to prevent spontaneous tumor regression. The dosage schedule was 15 mg/kg per day for 3 days before cell inoculation and for 4 weeks thereafter, which was followed by 10 mg/kg per day for the last week of the experiment. The rabbits were randomly divided into study group ($n = 3$) and control group ($n = 3$). Under general anesthesia selective ophthalmic arterial perfusion was performed in all the experimental rabbits. Melphalan (2.5 mg) was diluted with saline to prepare 15 ml solution and the solution was then injected in a pulse type into the rabbits of the experiment group, while only 15 ml saline was injected into the rabbits of the control group. The tumor growth condition at 7 and 14 days after the treatment was determined, and the results were compared between the two groups. **Results** During the period when the injection of cyclosporin A was used, the rabbits showed mild side effects. The retinoblastoma model was successfully established in all six experimental rabbits. Super-selective

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2015.02.014

基金项目: 广州市科技和信息化局项目 (2012J4100032)

作者单位: 200003 上海 第二军医大学附属长征医院放射科(张 靖、肖湘生); 广州市妇女儿童医疗中心介入与血管瘤科(张 靖、姜 华、陈昆山、李海波、蒋贻洲、林雀卿、李 丹、黄晓明)

通信作者: 肖湘生 E-mail: cjr.xiaoxiangsheng@vip.163.com

catheterization was performed 7 times, of which successful catheterization of ophthalmic artery was obtained in 6. One week after selective ophthalmic arterial perfusion of melphalan the tumor size was significantly decreased, and the tumor disappeared within 2 weeks. In the control group, swelling and tears of the right eye was observed in one rabbit, which spontaneously disappeared in one week. **Conclusion** For the treatment of retinoblastoma in rabbits, selective ophthalmic arterial perfusion of melphalan is feasible. The results of this study provide useful reference for further research on ophthalmic arterial perfusion for retinoblastoma. (J Intervent Radiol, 2015, 24: 146-149)

【Key words】 retinoblastoma; animal model; selective ophthalmic arterial perfusion; melphalan

视网膜细胞瘤(retinoblastoma, RB)是儿童最常见的眼内原发性恶性肿瘤,全球发病率约为 1/15 000~18 000,不治疗的病死率高达 100%^[1-3]。近年来发达国家通过开展常规眼科筛查,早期诊断治疗, RB 患儿 5 年生存率已达 87%~99%^[4]。发展中国家 RB 患儿往往因发现明显白瞳或斜视才就诊,延误了早期治疗时机,病死率仍高达 39%^[5]。

2008 年, Abramson 等^[6]使用微导管从股动脉穿刺进入到眼动脉,直接将化疗药物灌注到眼动脉,取得了显著的治疗效果。研究发现,该法到达眼球内的药物浓度是经静脉输入的 10 倍,且能够有效地降低眼球摘除率和患者因肿瘤转移导致的病死率^[7-9]。随着经眼动脉灌注化疗技术(SOAI)治疗 RB 的应用,使部分眼球避免了摘除,但术后视力恢复不佳,可能与治疗后眼底血管病变有关。

动物模型是医学研究的一个重要工具。20 世纪 90 年代已有转基因鼠的 RB 模型报道^[10]。但转基因鼠与人的眼睛体积差距较大,而且其股动脉较细,无法在鼠 RB 模型上实施 SOAI 术。2011 年,有学者成功建立了兔 RB 模型^[11],本研究参照该方法建立了模型,并经眼动脉灌注美法仑治疗兔 RB,观察 SOAI 技术用于动物模型的可行性,为进一步 SOAI 治疗 RB 的基础研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 新西兰兔 6 只由广东省医学实验动物中心提供, SPF 级, 雄性, 体质量 1.4~1.6 kg, 均具有健康合格证。HXO-Rb-44 RB 细胞由湖南医科大学提供。

1.1.2 主要仪器及试剂 CKX41 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司); 311 型恒温 CO₂ 孵箱(美国 Thermo); SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州净化有限公司); TDL-5-A 型低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂); DSA 机(美国 GE Innova 3100-IQ)。

DMEM/F12 培养液(批号 NYF0890, Hyclone 公司产品); 胎牛血清(批号 91110002, GIBCO 公司产品); 青/链霉素双抗(批号 13013202, 杭州吉诺生物医药有限公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 兔 RB 模型的建立 HXO-Rb-44 RB 细胞由广东省医学实验动物中心细胞室培养。使用 DMEM/F12 基础培养液加 10% 胎牛血清, 培养皿中加入 10 ml 培养液。待细胞长至 80%~90% 融合时, 弃去原培养液, PBS 液洗涤 2 次, 加入培养液, 小心吹打细胞, 1 传 3, 传代细胞观察 3 d。

新西兰兔于接种肿瘤细胞前 3 d 和注射后 1 个月均于臀部注射环孢素 A 15 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 1 个月后减量至 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 并持续到实验结束。取对数生长期 HXO-Rb44RB, 用 PBS 配成浓度为 2.0 × 10⁷ 个/ml 的细胞悬液, 取 0.1 ml 细胞悬液注射 6 只新西兰兔右眼视网膜间隙, 四环素可的松眼药膏涂眼。每日散瞳观察肿瘤生长情况, 2 周后进行超声检查。

1.2.2 SOAI 术治疗兔 RB 随机将 RB 实验动物分为对照组 3 只、实验组 3 只。于接种肿瘤细胞后 2 周, 肌肉注射 0.2~0.3 ml/kg 速眠新, 麻醉后仰卧位固定, 兔右侧股动脉根部皮肤常规脱毛消毒, 切开皮肤分离暴露股动脉, 行股动脉 Seldinger 穿刺, 成功后置入 4 F 小儿血管鞘。在 X 线透视引导下, 用 4 F 超滑 Cobra 导管(日本 Terumo)选择性插入右侧颈内动脉。增强器转至 90°, 头颅影像呈侧位, 采取人工手推对比剂(碘克沙醇)进行颈内动脉造影, 眼动脉显影后予以路图, 用 ev3 微导丝引导 1.7 F ev3 45°微导管行眼动脉超选择性插管, 造影确认后, 行眼动脉灌注。对照组灌注 0.9% 氯化钠溶液 15 ml, 实验组将美法仑 2.5 mg 用 0.9% 氯化钠溶液稀释至 15 ml 后灌注。术毕, 撤管后拔动脉鞘, 压迫穿刺点 5~10 min 并依次缝合各层组织后用无菌纱布包扎, 并预防性使用抗菌药物 3 d。术后分别于 7、14 d 观

察两组肿瘤生长情况。

1.3 统计分析

采用 SPSS16.0 统计软件,连续型数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔 RB 模型的建立

实验兔在注射环孢素 A 期间主要的不良反应为牙龈肿大、垂涎、体质量下降,并至实验结束。注射肿瘤细胞 7 d 后,6 只实验兔均可见肿瘤生长并持续增大。其中 2 只呈外生性生长(图 1),将其分别纳入实验组和对照组。其余 4 只用间接检眼镜及超声检查可见视网膜肿瘤块状生长。



图 1 肿瘤呈外生性生长

2.2 SOAI 术治疗兔 RB 结果

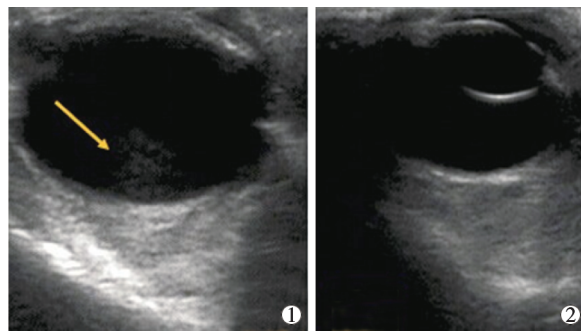
SOAI 术插管中,5 只成功插至眼动脉(图 2),1 只因眼动脉痉挛插管失败,2 d 后行左侧股动脉穿刺并成功插至眼动脉。



图 2 颈内动脉造影显示 RB 兔的眼动脉

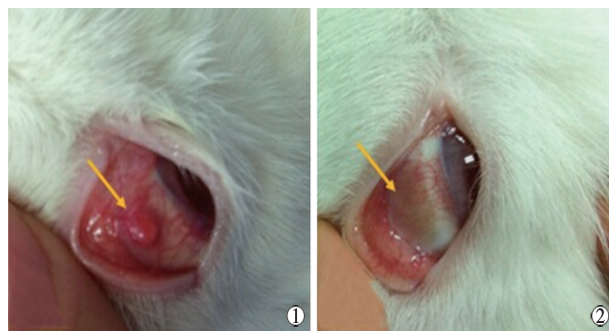
SOAI 术后 1 周,实验组肿瘤可见明显缩小,2 周后均消失(图 3、4)。对照组肿瘤持续生长,未见缩小。

SOAI 术后,实验组仅 1 只见右眼轻度红肿、流泪,1 周后红肿自行消退。实验组 3 只 RB 兔 SOAI 术后 2 周体质量由 (1.5 ± 0.2) kg 下降至 (1.2 ± 0.1) kg,对照组体质量由 (1.5 ± 0.1) kg 下降至 (1.3 ± 0.3) kg,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



①超声示 SOAI 治疗前肿瘤(箭头);②超声示同一只 RB 兔 SOAI 治疗后肿瘤消退

图 3 超声示肿瘤治疗前后变化



①SOAI 治疗前肿瘤呈外生性生长(箭头);②同一只 RB 兔 SOAI 治疗后肿瘤消失,只可见残留损伤的痕迹(箭头)

图 4 外生性肿瘤治疗前后变化

3 讨论

随着医疗水平的提高, RB 的治疗模式发生改变,由挽救生命转向挽救患儿生命的同时保住眼球甚至视力,提高患儿的生活质量^[12]。全身化疗联合一种或多种局部治疗(激光电凝术、冷冻、热疗)是近 10 余年来治疗 RB 的模式,使 RB 保眼治疗成为目标。虽然使用全身化疗联合局部治疗 RB 取得了良好的治疗效果,但是很多研究证实,单纯化疗结合局部治疗对于国际眼内 RB 分级标准(IIRC)D-E 期患儿的疗效并不显著^[13-14],而且化疗的不良反应也较大。眼内期 RB 化疗过程中可出现暂时性脊髓抑制,永久的听力损伤和肾损害,加之潜在性的二次肿瘤的发生,尤其是白血病^[15-16]。SOAI 治疗 RB 有效,并发症少,甚至可以改善视力,但对于眼内晚期的 RB,其保眼率依然达不到 100%^[17],而且随着美法仑的不断应用,其眼底血管的并发症也越来越受到关注^[18]。

2011 年,兔 RB 模型的成功建立,使 SOAI 的动物基础研究成为可能。因兔的眼睛与小儿眼睛的体积具有可比性,既往也有对兔 VX2 肝移植瘤进行股动脉穿刺并经肝动脉灌注栓塞化疗的报道^[19],使超选择兔眼动脉成为可能。本实验正是基于兔 RB 模

型的建立,初步探讨经眼动脉灌注美法仑治疗兔 RB 的可行性。

兔与裸鼠的区别在于兔具有自身免疫力,会影响 RB 肿瘤细胞的接种。为提高建模成功率,我们采用 SPF 级兔作为实验对象,其饲养环境干洁,对培养瘤种更适合,且肌注环孢素 A,抑制了其自身免疫力,有利于肿瘤细胞的生长^[20]。本实验中,兔 RB 模型的成功建立,其中有 2 只呈外生性生长,可能原因是未将肿瘤细胞种植于视网膜下,而是种植于巩膜下所致,但经 SOAI 术后肿瘤也发生消退,证明有药物到达肿瘤供养的血管内。

2004 年,日本学者报道了 SOAI 治疗 RB 的技术^[21]。该技术使用球囊导管阻碍颈内动脉穹窿上大脑供血,再经导管于球囊近端灌注化疗药,迫使化疗药大部分直接进入眼动脉,起到局部化疗的作用。因其该技术致使药物未能全部进入眼动脉,影响了疗效。2008 年,超选择直接灌注眼动脉法的出现,提高了治疗效果。本实验,7 次插管中 6 次成功。1 只 RB 兔因眼动脉痉挛致使插管失败,2 d 后行左侧股动脉穿刺并成功插至眼动脉。对此我们建议,应由有血管介入经验的人员进行操作,动作要轻柔,以提高技术成功率。

本研究存在的不足之处是样本量少,且肿瘤生长时间短,导致肿瘤体积小,所以只初步探讨经眼动脉灌注化疗在动物模型的可行性,为进一步深入的基础研究提供参考。

[参 考 文 献]

- [1] Yun J, Li Y, Xu CT, et al. Epidemiology and Rb1 gene of retinoblastoma[J]. Int J Ophthalmol, 2011, 4: 103 - 109.
- [2] Chan HS, Gallie BL, Munier FL, et al. Chemotherapy for retinoblastoma[J]. Ophthalmol Clin North Am, 2005, 18: 55 - 63.
- [3] Tsui JY, Dalgard C, Van Quill KR, et al. Subconjunctival topotecan in fibrin sealant in the treatment of transgenic murine retinoblastoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49: 490 - 496.
- [4] Chan MP, Hungerford JL, Kingston JE, et al. Salvage external beam radiotherapy after failed primary chemotherapy for bilateral retinoblastoma: rate of eye and vision preservation[J]. Br J Ophthalmol, 2009, 93: 891 - 894.
- [5] Schiedler V, Dubovy SR, Murray TG. Snare technique for enucleation of eyes with advanced retinoblastoma[J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125: 680 - 683.
- [6] Abramson DH, Dunkel IJ, Brodie SE, et al. A phase I/II study of direct intraarterial (ophthalmic artery) chemotherapy with melphalan for intraocular retinoblastoma initial results [J]. Ophthalmology, 2008, 115: 1398 - 1404, 1404.e1.
- [7] Eagle RC. High - risk features and tumor differentiation in retinoblastoma: a retrospective histopathologic study [J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133: 1203 - 1209.
- [8] 杜世伟, 杨新吉, 高天, 等. 超选眼动脉介入灌注美法仑治疗眼内期视网膜母细胞瘤[J]. 中华神经外科杂志, 2014, 30: 263 - 266.
- [9] 张靖, 姜华, 申刚, 等. 经导管眼动脉灌注化疗治疗晚期视网膜母细胞瘤 30 例[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 31 - 34.
- [10] Windle JJ, Albert DM, O'Brien JM, et al. Retinoblastoma in transgenic mice[J]. Nature, 1990, 343: 665 - 669.
- [11] Kang SJ, Grossniklaus HE. Rabbit model of retinoblastoma [J]. J Biomed Biotechnol, 2011: 394730.
- [12] Shields CL, Manjandavida FP, Lally SE, et al. Intra - arterial chemotherapy for retinoblastoma in 70 eyes: outcomes based on the international classification of retinoblastoma[J]. Ophthalmology, 2014, 121: 1453 - 1460.
- [13] Shields CL, Shields JA. Basic understanding of current classification and management of retinoblastoma [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2006, 17: 228 - 234.
- [14] Shields CL, Ghassemi F, Tuncer S, et al. Clinical spectrum of diffuse infiltrating retinoblastoma in 34 consecutive eyes [J]. Ophthalmology, 2008, 115: 2253 - 2258.
- [15] Shields CL. The international classification of retinoblastoma is practical and predictable. Yearbook of Ophthalmology [R]. St Louis: Mosby. 2008: 227 - 230.
- [16] Gombos DS, Hungerford J, Abramson DH, et al. Secondary acute myelogenous leukemia in patients with retinoblastoma: is chemotherapy a factor? [J]. Ophthalmology, 2007, 114: 1378 - 1383.
- [17] Suzuki S, Yamane T, Mohri M, et al. Selective ophthalmic arterial injection therapy for intraocular retinoblastoma: the long - term prognosis[J]. Ophthalmology, 2011, 118: 2081 - 2087.
- [18] Shields CL, Bianciotto CG, Jabbour P, et al. Intra - arterial chemotherapy for retinoblastoma: report No. 2, treatment complications[J]. Arch Ophthalmol, 2011, 129: 1407 - 1415.
- [19] 王丽萍, 周希瑗, 彭周贵, 等. 裸鼠视网膜下注射 HXO-Rb44 细胞建立视网膜母细胞瘤动物模型[J]. 眼科研究, 2010, 28: 582 - 585.
- [20] Blanco PL, Marshall JC, Anteck E, et al. Characterization of ocular and metastatic uveal melanoma in an animal model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46: 4376 - 4382.
- [21] Suzuki S, Kaneko A. Management of intraocular retinoblastoma and ocular prognosis[J]. Int J Clin Oncol, 2004, 9: 1 - 6.

(收稿日期:2014-08-03)

(本文编辑:李欣)