

## • 实验研究 Experimental research •

## 骨水泥对兔脊柱 VX2 肿瘤转移模型的作用研究

黄 昊, 何仕诚, 冯国栋, 杜瑞杰, 朱海东, 方 文, 郭金和, 邓 钢

**【摘要】 目的** 探讨聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)骨水泥对兔脊柱 VX2 肿瘤的杀伤作用。**方法** 成功建立兔 VX2 脊柱转移肿瘤模型 18 只,随机分为 A、B、C 组,每组各 6 只,在 CT 导下向 VX2 肿瘤中心分别注入 PMMA 或生理盐水,其中 A 组注入 PMMA 0.3 ml、B 组注入 PMMA 0.1 ml、C 组注入生理盐水 0.3 ml。术后 24 h 处死模型兔,A、B 组分别于距离 PMMA 团块边缘 1、5、10、15 mm 处不同方向各取 4 个肿瘤组织块,C 组于瘤体中心至表面不同的 4 个位置各取 1 块肿瘤组织,采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)法检测肿瘤细胞凋亡率。**结果** 16 只模型兔成功注入 PMMA 骨水泥,A、B 组手术成功率均为 5/6,C 组为 6/6,无显著性差异。A 组距 PMMA 边缘 1、5、10 mm 处肿瘤细胞平均凋亡率分别为  $(65.75 \pm 18.81)\%$ 、 $(50.00 \pm 14.24)\%$ 、 $(14.95 \pm 8.98)\%$ ,与对照组  $(9.79 \pm 5.24)\%$  相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );15 mm 处肿瘤细胞平均凋亡率为  $(10.30 \pm 8.13)\%$ ,与对照组相比差异无统计学意义。B 组距 PMMA 边缘 1、5 mm 处肿瘤细胞平均凋亡率分别为  $(49.20 \pm 15.57)\%$ 、 $(17.75 \pm 9.28)\%$ ,与对照组相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),其余观测点无显著性差异。A、B 两组距 PMMA 边缘 1、5、10 mm 处肿瘤细胞平均凋亡率比较,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ )。**结论** PMMA 可促进肿瘤细胞凋亡,适量增加 PMMA 注入量可增加肿瘤细胞凋亡范围。

**【关键词】** 聚甲基丙烯酸甲酯;兔;VX2 肿瘤;脊柱转移;凋亡

中图分类号:R681.5 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2015)-06-0520-04

**The killing effect of bone cement on spinal metastasis of transplanted VX2 carcinoma in experimental rabbit models** HUANG Hao, HE Shi-cheng, FENG Guo-dong, DU Rui-jie, ZHU Hai-dong, FANG Wen, GUO Jin-he, DENG Gang. Department of Radiology, Affiliated Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing, Jiangsu Province 210009, China

Corresponding author: HE Shi-cheng, E-mail: shichenghe@vip.sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the killing effect of polymethylmethacrylate (PMMA) on spinal metastasis of transplanted VX2 carcinoma in experimental rabbit models. **Methods** Spinal metastasis of transplanted VX2 carcinoma model was successfully established in 18 rabbits. The experimental rabbits were randomly and equally divided into three groups with 6 rabbits in each group. Under CT guidance, PMMA or saline was injected into the center of VX2 tumor; in group A 0.3 ml of PMMA was used, in group B 0.1 ml of PMMA was used and in group C (control group) 0.3 ml saline was used. Twenty-four hours after the injection, the animals were sacrificed. Four tissue samples were obtained from the sites at 1 mm, 5 mm, 10 mm and 15 mm away from the PMMA mass in each rabbit of group A and group B, while four tissue samples were collected from different four sites from the tumor's center to border in each rabbit of group C. TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method was used to determine the tumor cell apoptosis rate. **Results** After successful establishment of rabbit model, injection of PMMA was performed in sixteen among

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2015.06.013

基金项目:国家自然科学基金(81171434)、江苏省临床医学科技专项项目(BL2013029)

作者单位:210009 南京 东南大学附属中大医院放射科(黄 昊、冯国栋、杜瑞杰)、介入与血管外科(何仕诚、朱海东、方 文、郭金和、邓 钢)

通信作者:何仕诚 E-mail: shichenghe@vip.sina.com

the eighteen rabbits. Technical success rates were 83.3% in both group A and B, and the success rate was 100% in group C. The difference in technical success rate was not significant. The mean tumor cell apoptosis rates of spinal VX2 carcinoma at 1 mm, 5 mm and 10 mm away from the PMMA mass in group A were  $(65.75 \pm 18.81)\%$ ,  $(50.00 \pm 14.24)\%$  and  $(14.95 \pm 8.98)\%$  respectively. The mean apoptosis rate in the control group was  $(9.79 \pm 5.24)\%$ ; the differences between the group A and the control group were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The mean tumor cell apoptosis rate of spinal VX2 carcinoma at 15 mm away from the PMMA mass in group A was  $(10.30 \pm 8.13)\%$ , which was not significantly different with that of the control group. The mean tumor cell apoptosis rates of spinal VX2 carcinoma at 1 mm and 5 mm away from the PMMA mass in group B were  $(49.20 \pm 15.57)\%$  and  $(17.75 \pm 9.28)\%$  respectively, which was significantly different with that of the control group ( $P < 0.05$ ); the mean tumor cell apoptosis rates at 10 mm and 15 mm away from the PMMA mass in group B were not significantly different with those of the control group. Statistically significant differences in the mean tumor cell apoptosis rates determined at 1 mm, 5 mm and 10 mm away from the PMMA mass existed between group A and group B ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** PMMA can promote the apoptosis of tumor cells, properly increasing the injected amount of PMMA can enlarge the extent of tumor cell apoptosis. (J Intervent Radiol, 2015, 24: 520-523)

**【Key words】** polymethylmethacrylate; rabbit; VX2 carcinoma; spinal metastasis; apoptosis

各种恶性肿瘤晚期发生脊柱转移可达 30%~70%, 对其治疗的主要目的是缓解局部疼痛、改善神经功能、保持脊柱稳定性, 并尽可能控制局部病灶<sup>[1]</sup>。经皮椎体成形术(PVP)经过 20 余年发展已成为治疗脊柱转移瘤的重要手段, 但术中所使用的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)骨水泥是否对其周围的肿瘤组织有杀伤作用, 尚未得到肯定的验证<sup>[1-3]</sup>。本研究在前期建立的可重复、较稳定的兔脊柱肿瘤转移模型基础上, 在经 CT 引导下经皮穿刺注入 PMMA, 以探究其对肿瘤的杀伤作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验取新西兰大白兔 25 只(3~4 月龄, 体重 2.5~3.5 kg, 雌雄不限), 由东南大学动物实验中心提供(实验动物许可证编号: SYXK 苏-2010-0004)。VX2 肿瘤株由东南大学分子影像与功能影像实验室提供, 每隔 4 周经兔大腿部肌肉成瘤传代。实验材料还包括乙二胺四乙酸(EDTA, 武汉博士德生物工程有限公司)、苏木精-伊红(HE, 上海碧云天生物技术有限公司)、4%甲醛(东南大学附属中大医院病理科)、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)试剂盒(瑞士 Roche 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 兔脊柱 VX2 肿瘤转移模型的建立** 兔脊柱 VX2 肿瘤模型的建立和影像学评价方法参照凌龙等<sup>[2]</sup>报道。术后 28 d 行腰椎 CT 扫描检查, 观测到兔

椎体伴有明显骨质破坏时视为建模成功(图 1①)。

**1.2.2 实验分组及手术步骤** 成功构建兔脊柱 VX2 肿瘤模型共计 18 只, 随机分为 A、B、C 组, 每组 6 只。实验手术于第 28 天施行, 1%异戊巴比妥钠(3 ml/kg)经耳缘静脉麻醉模型兔并固定行腰椎 CT 平扫, 用 18 G 血管穿刺针在 CT 引导下穿刺入椎体中心, A、B 两组分别注入 PMMA 0.3 ml 和 0.1 ml(图 1②③), C 组为对照组(仅注入生理盐水 0.3 ml)。PMMA 按临床常用比例调配后 120 s 开始注入<sup>[3]</sup>。

**1.2.3 术后观察与评价** 术后 24 h 为观察终点, 处死实验兔后取出目标椎体, 脱钙后逐层切片, 选取肿瘤侵蚀椎体面积最广的层面进行观察。实验组于 PMMA 周围 4 个方向, 分别距 PMMA 边缘 1 mm(紧贴 PMMA 边缘处)、5 mm、10 mm 及 15 mm 处各取一肿瘤组织块, 对照组于瘤体中心至表面不同的 4 个位置各取一肿瘤组织块, 并行 HE 染色及 TUNEL 染色<sup>[4]</sup>后, 检测肿瘤细胞凋亡指数(AI)<sup>[5]</sup>。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。实验组距骨水泥边缘不同距离肿瘤细胞凋亡率与对照组比较采用 Dunnett T3 多重比较, 手术成功率比较采用 Fisher 精确检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 手术情况

25 只新西兰大白兔中 18 只成功建立兔脊柱



①目标椎体内植入 VX2 瘤块后 28 d 轴位 CT 显示骨质破坏明显,证实建模成功;②CT 引导下 18 G 穿刺针穿刺入瘤体中心;③注射 PMMA 0.3 ml 后的轴位 CT 显示 PMMA 在破坏区内充填良好

图 1 兔脊柱 VX2 肿瘤模型注入 PMMA 实验

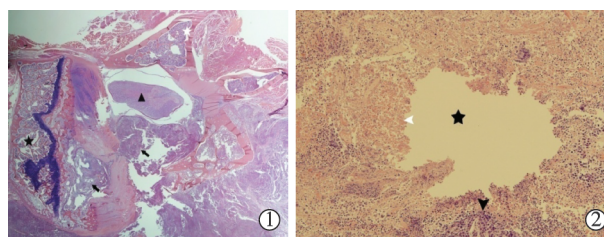
VX2 肿瘤模型,建模成功率为 72%(18/25)。注入 PMMA 前共有 15 只模型兔出现后肢瘫痪,A、B、C 组各 5 只。

18 只脊柱 VX2 肿瘤模型兔穿刺均获成功,其中 A、B 实验组共 10 只模型兔(10/12)成功注入 PMMA,达到实验预期终点。A 组有 4 只模型兔椎体旁出现少量 PMMA 渗漏,术中麻醉死亡 1 只;B 组椎体旁均无 PMMA 渗漏,术中麻醉死亡 1 只。对照组实验均获成功(6/6)。对照组与实验组间手术成功率比较,差异无统计学意义( $P=0.529$ )。术后所有存活实验兔后肢情况与术前相同。

## 2.2 组织学检查

术后 24 h 共取出 A、B 组转移瘤椎体各 5 节,C 组转移瘤椎体 6 节。组织 HE 染色结果见图 2, TUNEL 荧光染色见图 3。术后距 PMMA 边缘不同距离肿瘤细胞凋亡率见表 1。A 组距 PMMA 边缘 1、5、10 mm 处肿瘤细胞平均凋亡率与对照组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),而 15 mm 处肿瘤细胞平均凋亡率与对照组比较,差异无统计学意义;B 组距 PMMA 边缘 1、5 mm 处肿瘤细胞平均凋亡率与对照组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),其余观测点无统计学差异。A、B 组距 PMMA 边缘 1、

5、10 mm 处肿瘤细胞平均凋亡率比较,差异均有显著统计学意义( $P<0.001$ )。



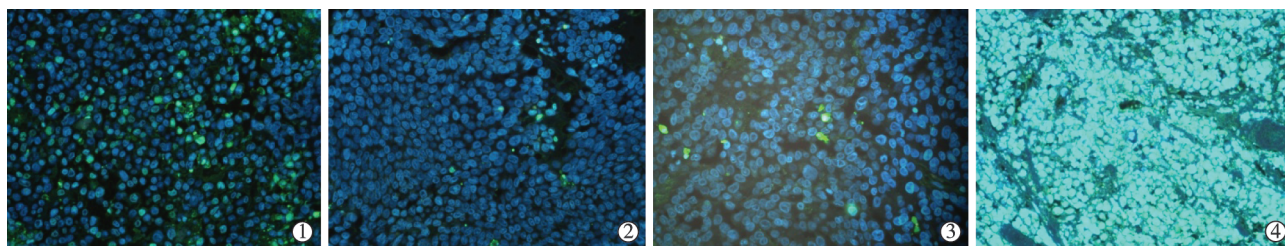
①HE 染色( $\times 20$ )可见椎体(黑色星形)及横突(白色星形)间大量密集排列的 VX2 肿瘤细胞(箭头),部分边界模糊并压迫脊髓(三角形);②HE 染色( $\times 100$ )剔除骨水泥后残余空洞(星形),肿瘤细胞(黑箭头)及坏死细胞(白箭头)

图 2 兔脊柱 VX2 肿瘤模型注入 PMMA 后病理表现

表 1 VX2 肿瘤不同位置标本细胞凋亡率

距离	凋亡率(%)			A、C 组比较 $P$ 值	B、C 组比较 $P$ 值
	A 组	B 组	C 组		
1 mm	65.75 $\pm$ 18.81	49.20 $\pm$ 15.57		<0.001	<0.001
5 mm	50.00 $\pm$ 14.24	17.75 $\pm$ 9.28		<0.001	<0.001
10 mm	14.95 $\pm$ 8.98	10.05 $\pm$ 5.39	9.79 $\pm$ 5.24	<0.001	0.978
15 mm	10.30 $\pm$ 8.13	8.95 $\pm$ 5.09		0.542	0.931

注:A 组与 B 组间 1、5、10 mm 处细胞凋亡率比较,差异有显著统计学意义( $P$  值均 $<0.001$ );两组间 15 mm 处细胞凋亡率比较,差异无统计学意义



①A 组 1 mm 处几乎均为 TUNEL 染色阳性凋亡细胞(绿色);②A 组 10 mm 处可见大量 DAPI 染色类圆形细胞核(蓝色)中夹杂大小不等 TUNEL 染色阳性凋亡细胞(绿色);③A 组 15 mm 处可见大量 DAPI 染色类圆形细胞核(蓝色),极少见 TUNEL 染色阳性凋亡细胞(绿色);④C 组(对照组)表现同③

图 3 距 PMMA 边缘不同距离 VX2 肿瘤标本的 TUNEL 染色荧光显微镜下表现( $\times 400$ )



### 3 讨论

#### 3.1 兔脊柱 VX2 肿瘤转移模型注入 PMMA 方法

由于 CT 可准确显示穿刺针进入靶椎体肿瘤骨质破坏区内,故本实验采用经椎体侧后缘与椎弓根交界处穿刺入路注入 PMMA<sup>[2]</sup>,手术成功率分别为实验组 10/12、对照组 6/6,组间无显著性差异。我们检索了 Medline、中国万方及知网等数据库,迄今未见有兔椎体内注入骨水泥的相关研究报告,因而在本实验前关于兔椎体内应注入多少量骨水泥无经验可参考。为此,我们进行多次预实验,发现兔腰椎内 PMMA 注入量增加至 0.5 ml 时均有 PMMA 较多渗漏入椎管,而本实验组 PMMA 渗漏发生率为 40% (4/10),均发生于注入 PMMA 0.3 ml 的 A 组,提示随着 PMMA 注入量增加,渗漏发生风险也随之增大,故兔脊柱 VX2 肿瘤内注入 PMMA 量不宜超过 0.3 ml。

#### 3.2 PMMA 对 VX2 肿瘤杀伤作用的评价

凋亡作为细胞死亡的形式之一,可在一定程度上反映细胞周围环境刺激或变化的情况<sup>[6]</sup>。正常或繁殖细胞没有脱氧核糖核酸断裂,不被 TUNEL 染色,因此本实验采用 TUNEL 法<sup>[7]</sup>评价 PMMA 对肿瘤杀伤程度及范围是切实可行的。

尽管 PMMA 对肿瘤细胞具有急性杀伤作用已被证实<sup>[8]</sup>,但杀伤程度及范围是否与注射量相关,仍然无肯定结论。Wang 等<sup>[9]</sup>研究发现,VX2 肿瘤自然生长 4 周内一般无明显坏死(即细胞自然凋亡作用较小),且兔椎体内植入 VX2 肿瘤约 28 d 时 CT 可观测到兔椎体伴有明显骨质破坏<sup>[2]</sup>,故本实验选择在兔椎体内植入 VX2 肿瘤后第 28 天时注入 PMMA 并设置对照组,从而避免肿瘤细胞自然凋亡的干扰。通过本实验可以推论,注入 PMMA 0.1 ml 对 VX2 肿瘤细胞的杀伤范围为 5~10 mm,而注入 PMMA 0.3 ml 则为 10~15 mm。我们认为,在一定范围内增加 PMMA 注射量可增加对肿瘤细胞的杀伤作用。

Bhatt 等<sup>[1]</sup>研究认为,PMMA 对肿瘤的杀伤机制可能在于:①PMMA 单体细胞毒作用;②PMMA 聚合热作用。然而本实验中,B 组中单体理论注射量仅为 0.02 ml,且大部分已与 PMMA 粉剂聚合,PMMA 0.1 ml 注射后肿瘤细胞凋亡范围约为 5 mm,因此仅用单体细胞毒性解释其杀伤作用难以令人信服;PMMA 4 ml 聚合时产生的最高温度可达 61℃<sup>[10]</sup>,增加 PMMA 注射量可增加其与肿瘤的接触面积,同时

产生的总热量( $Q=\Delta t \cdot m \cdot c$ )也势必增加,我们因而认为聚合热对肿瘤起主要杀伤作用。Chen 等<sup>[11]</sup>研究认为,血流及脑脊液流动会造成热量散失,骨组织与软组织之间热传导也存在差异,这些均会对肿瘤与脊髓的实际温度产生影响,可见采用兔脊柱 VX2 肿瘤转移模型研究 PMMA 对肿瘤的杀伤作用的可信度应更高。本实验中 A 组 1 mm 处肿瘤细胞凋亡率与 B 组比较有显著差异,提示增加 PMMA 注射量可提高肿瘤细胞凋亡率。

#### [参考文献]

- [1] Bhatt AD, Schuler JC, Boakye M, et al. Current and emerging concepts in non-invasive and minimally invasive management of spine metastasis[J]. *Cancer Treat Rev*, 2013, 39: 142-152.
- [2] 凌 龙, 何仕诚, 黄 昊, 等. 影像学对经皮穿刺兔脊柱 VX2 肿瘤模型的检测价值探讨[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93: 3131-3134.
- [3] 何仕诚, 滕皋军, 方 文, 等. PVP 联合动脉栓塞治疗复杂性脊椎转移性肿瘤[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91: 175-179.
- [4] 王世东, 王宇泽, 曾令员, 等. 基质细胞衍生因子-1 对兔膝关节软骨细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30: 781-783.
- [5] Takamatsu S, Matsui O, Gabata TA, et al. Selective induction hyperthermia following transcatheter arterial embolization with a mixture of nano-sized magnetic particles (ferucarbotran) and embolic materials: feasibility study in rabbits[J]. *Radiat Med*, 2008, 26: 179-187.
- [6] Lin LT, Wu SJ, Lin CC. The anticancer properties and apoptosis-inducing mechanisms of cinnamaldehyde and the herbal prescription Huang-Lian-Jie-Du-Tang in human hepatoma cells [J]. *J Tradit Complement Med*, 2013, 3: 227-233.
- [7] 李海峰, 陈方敏, 石家齐, 等. 增韧基团-姜黄素单脂增强对前列腺癌的抑瘤作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30: 2493-2495.
- [8] Sun G, Li L, Jin P, et al. Percutaneous vertebroplasty for painful spinal metastasis with epidural encroachment[J]. *J Surg Oncol*, 2014, 110: 123-128.
- [9] Wang L, Yao Q, Wang J, et al. MRI and hybrid PET/CT for monitoring tumour metastasis in a metastatic breast cancer model in rabbit[J]. *Nucl Med Commun*, 2008, 29: 137-143.
- [10] 何仕诚, 滕皋军, 邓 钢, 等. 添加不同类型、比例的显影剂后骨水泥性能的变化[J]. *介入放射学杂志*, 2006, 15: 238-241.
- [11] Chen L, Xiao J, Su IC, et al. Establishing a rabbit spinal tumor model for nonvascular interventional therapy through CT-guided percutaneous puncture inoculation[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2015, 36: 153-159.

(收稿日期:2014-11-27)

(本文编辑:边 佑)