

## • 实验研究 Experimental research •

## 载药微球加载贝伐珠单抗介入栓塞治疗兔 VX2 肝癌的抗血管生成效果

姚远方, 高飞, 张雪松, 王魁阳, 隋成旭, 张亮, 吴杰, 宋磊

**【摘要】 目的** 探讨载药微球加载贝伐珠单抗经导管动脉化疗栓塞(TACE)治疗兔 VX2 肝癌模型的抗血管生成效果。**方法** 构建 30 只新西兰大白兔 VX2 肝癌模型,随机分为 HepaSphere 载药微球加载贝伐珠单抗组(A组,  $n=10$ )、Embosphere 微球联合贝伐珠单抗组(B组,  $n=10$ )、单纯 HepaSphere 载药微球组(C组,  $n=10$ )。酶联免疫吸附试验(ELISA)法定量检测 TACE 术前 1 d、术后 1、7、14 d 各组血清血管内皮细胞生长因子(VEGF)水平,术前 1 d、术后 14 d 腹部 MRI 检测各组肿瘤直径,计算瘤体体积和肿瘤增长率。**结果** 术后 7 d A 组、B 组血清 VEGF 水平与 C 组相比均较低( $P<0.05$ ),且 A 组低于 B 组;术后 14 d 3 组血清 VEGF 水平两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),A 组最低,C 组最高。术后 14 d 3 组肿瘤增长率两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),A 组最低。**结论** 载药微球加载贝伐珠单抗 TACE 治疗可明显降低兔 VX2 肝癌模型术后血清 VEGF 水平和肿瘤增长率,疗效优于单纯载药微球或栓塞微球联合贝伐珠单抗治疗。

**【关键词】** 载药微球; 贝伐珠单抗; 经导管动脉化疗栓塞术; 兔 VX2 肝癌模型; 血管内皮细胞生长因子

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2021)-03-0254-04

**The anti-angiogenesis effect of interventional embolization using drug-loaded microspheres with bevacizumab in treating rabbit VX2 hepatocellular carcinoma** YAO Yuanfang, GAO Fei, ZHANG Xuesong, WANG Kuifang, SUI Chengxu, ZHANG Liang, WU Jie, SONG Lei. Department of Intervention, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning Province 116027, China

Corresponding author: SONG Lei, E-mail: songlei\_1975@126.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the anti-angiogenesis effect of transcatheter arterial chemoembolization(TACE) by using drug-bearing microspheres loaded with bevacizumab in treating rabbit VX2 hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** VX2 HCC model was established in 30 New Zealand white rabbits. The experimental rabbits were randomly and equally divided into drug-bearing microspheres (HepaSphere) loaded with bevacizumab group (group A,  $n=10$ ), Embosphere microspheres combined with bevacizumab group (group B,  $n=10$ ), and simple HepaSphere microspheres group (group C,  $n=10$ ). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to quantitatively test the preoperative 1-day and postoperative 1-day, 7-day, 14-day serum vascular endothelial growth factor(VEGF) levels. Abdominal MRI was performed at one day before and 14 days after the treatment to measure the tumor diameters and to calculate the tumor volume and tumor growth rate. **Results** The postoperative 7-day serum VEGF level in both group A and group B was lower than that in group C ( $P<0.05$ ), which in group A was lower than that in group B. The differences in postoperative 14-day serum VEGF level between each other among the three groups were statistically significant ( $P<0.05$ ), which was lowest in group A and highest in group C. Statistically significant differences in postoperative 14-day tumor growth rate existed between each other among the three groups ( $P<0.05$ ), which was lowest in group A. **Conclusion** In treating rabbit VX2 HCC, TACE by using drug-bearing microspheres(HepaSphere) loaded with bevacizumab can remarkably decrease postoperative serum VEGF level and tumor growth rate in rabbit

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2021.03.008

基金项目: 辽宁省大连市医学科学研究计划项目(1712047)

作者单位: 116027 辽宁 大连医科大学附属第二医院综合介入科

通信作者: 宋磊 E-mail: songlei\_1975@126.com

VX2 HCC models and its curative effect is superior to simple HepaSphere microspheres as well as to Embosphere microspheres combined with bevacizumab. (J Intervent Radiol, 2021, 30: 254-257)

**【Key words】** drug-bearing microsphere; bevacizumab; transcatheter arterial chemoembolization; rabbit VX2 hepatocellular carcinoma model; vascular endothelial growth factor

肝细胞癌(HCC)是全球发病率和死亡率较高的恶性肿瘤,目前早期肝癌最有效的治疗方法是手术切除<sup>[1]</sup>,但多数患者确诊时已为中晚期。对于无法手术切除的中晚期肝癌或术后复发肝癌患者,经导管动脉化疗栓塞术(TACE)是一种可延长患者生存期的有效治疗方式<sup>[2-3]</sup>。然而 TACE 术中栓塞不够彻底、术后相关促血管生成物质增多,可促使肿瘤血管生成和侧支循环形成,导致肝癌复发或转移,甚至新瘤灶生成<sup>[4]</sup>。因此寻找一种新的介入栓塞模式并探索其机制和有效性已成为目前肝癌诊治热点。贝伐珠单抗作为广泛研究的抗血管生成药物,已在多种恶性肿瘤治疗中取得良好效果。目前临床上正探索应用载药微球和贝伐珠单抗分别或联合治疗肝癌。本实验通过检测血清血管内皮细胞生长因子(VEGF)、肿瘤增长率,评估载药微球联合贝伐珠单抗 TACE 治疗兔 VX2 肝癌模型的抗血管生成作用,为载药微球联合贝伐珠单抗临床 TACE 治疗肝癌提供相应实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和主要试剂仪器

30 只新西兰大白兔(大连医科大学动物实验中心提供),雌雄不限,体质量 2.0~2.5 kg。贝伐珠单抗(瑞士 Roche 公司),HepaSphere 载药微球、Embosphere 微球(美国 Merit Medical Systems 公司),兔 VEGF 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司),2.7 F SP 微导管(美国 Cook 公司),H-5000 型 DSA 机(荷兰 Philips 公司)。

### 1.2 兔肝癌模型制备

将 VX2 瘤组织接种于实验兔大腿内侧近腹股沟区皮下,2 周后全身麻醉、无菌条件下剥离肿瘤组织,剪碎至 1~2 mm<sup>3</sup> 大小。采用开腹包埋法行肿瘤肝内移植,术后肌内注射青霉素 80 万 U/d,连续 3 d。

### 1.3 分组与微球配置

瘤兔随机分为 3 组:HepaSphere 载药微球加载贝伐珠单抗组(A 组, $n=10$ )、Embosphere 微球联合贝伐珠单抗组(B 组, $n=10$ )、单纯 HepaSphere 载药微球组(C 组, $n=10$ )。微球配置:A 组以 2 倍法配置,贝伐珠单抗(100 mg,4 mL)+0.9%NaCl 溶液(1 mL)

+粒径 50~100  $\mu$ m HepaSphere 载药微球(25 mg)混匀 10 min 后,用 45 mL 稀释液(对比剂和 0.9%NaCl 溶液 1:1 混合)稀释 10 倍成 50 mL 栓塞剂,抽取 5 mL 行经肿瘤供血动脉缓慢栓塞治疗;B 组,贝伐珠单抗(100 mg,4 mL)+0.9%NaCl 溶液(46 mL)混匀后,取 5 mL 经肿瘤供血动脉缓慢灌注,再从粒径 100~300  $\mu$ m Embosphere 微球(25 mg)稀释液 50 mL 中抽取 5 mL 行经肿瘤供血动脉缓慢栓塞治疗;C 组,0.9%NaCl 溶液(5 mL)+粒径 50~100  $\mu$ m HepaSphere 载药微球(25 mg)混匀 10 min 后,用 45 mL 稀释液(对比剂和 0.9%NaCl 溶液 1:1 混合)稀释 10 倍成 50 mL 栓塞剂,抽取 5 mL 行经肿瘤供血动脉缓慢栓塞治疗。TACE 术中对对比剂总用量不超过 5 mL/kg。

### 1.4 TACE 手术

瘤兔耳缘静脉注射地西泮(0.25 mg/kg),静脉注射氯胺酮(10 mg/kg)麻醉,右腹股沟区备皮、消毒、铺巾,逐层切开腹股沟区皮肤,仔细暴露并分离股动脉;手术缝合线分别穿入股动脉两端,缝合线远端结扎后提起缝合线,穿刺股动脉,经穿刺针置入 2.7 F SP 微导管,DSA 下选择性插管至腹腔干,观察腹腔干走行及肿瘤供血情况;微导丝引导下超选至肿瘤供血动脉,证实肿瘤染色后,经 SP 微导管 A 组注入 5 mL 配置的栓塞制剂,B 组灌注 5 mL 贝伐珠单抗稀释液后再注入 5 mL Embosphere 微球栓塞制剂,C 组注入 5 mL HepaSphere 微球栓塞制剂,栓塞终点为肿瘤染色消失;操作结束后撤出导管,穿刺点两端股动脉结扎,逐层缝合腹股沟区皮肤。术后肌内注射青霉素 80 万 U/d 预防感染,连续 3 d。

### 1.5 血清 VEGF 和肿瘤增长率检测

TACE 术前 1 d,术后 1、7、14 d 分别抽取 3 组瘤兔耳缘静脉血 3 mL,2 000 r/min 离心 5 min,取上血液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤定量测定各组血清 VEGF 水平。

术前 1 d、术后 14 d 分别对 3 组瘤兔行腹部 3.0T MRI 检查,影像学测量肿瘤最大直径( $d_1$ )和最小直径( $d_2$ )(单位:cm),计算瘤体体积( $V$ ): $V=0.5 \times d_1 \times d_2$ ;肿瘤增长率= $V$  治疗后/ $V$  治疗前<sup>[5]</sup>。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资

表 1 VX2 瘤兔 TACE 术前后各组血清 VEGF 水平变化

组别	术前 1 d	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d
A 组(n=10)	599.79±21.62	869.27±52.99	746.18±46.33	617.26±36.05
B 组(n=10)	596.87±34.26	861.43±87.68	764.31±72.28	804.25±80.64
C 组(n=10)	597.43±42.32	843.02±12.13	1 024.73±44.65	1 247.35±37.82

料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,血清 VEGF 组间比较用两因素重复测量方差分析,肿瘤增长率组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用最小显著性差异(LSD)-*t* 检验,统计结果以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

血清 VEGF 检测显示,术前 1 d、术后 1 d 3 组血清 VEGF 水平两两比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ); 术后 7 d A 组、B 组血清 VEGF 水平与 C 组相比均较低( $P<0.05$ ),且 A 组低于 B 组;术后 14 d 3 组血清 VEGF 水平两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),A 组最低,C 组最高,见表 1、图 1。

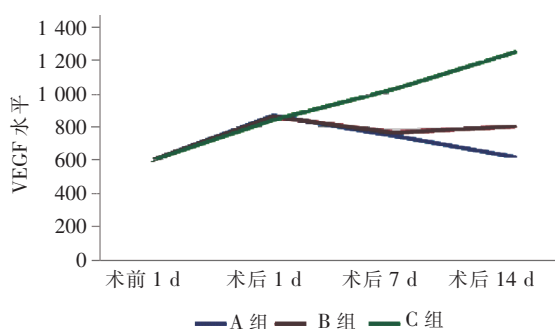


图 1 VX2 瘤兔 TACE 术前后各组血清 VEGF 变化趋势图

肿瘤增长率检测显示,术前 1 d 3 组瘤兔瘤体两两比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ); 3 组术后 14 d 肿瘤体积、肿瘤增长率两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),A 组肿瘤体积、肿瘤增长率最低,见表 2。

表 2 VX2 瘤兔介入治疗前后肿瘤体积变化  $\bar{x}\pm s$ 

组别	术前 1 d/cm <sup>3</sup>	术后 14 d/cm <sup>3</sup>	肿瘤增长率/%
A 组(n=10)	0.896±0.134	1.303±0.189	156.86±7.91
B 组(n=10)	0.902±0.154	1.885±0.242	223.62±63.64
C 组(n=10)	0.895±0.125	2.494±0.274	290.27±19.46

## 3 讨论

TACE 通过对肿瘤供血动脉灌注化疗药物和栓塞阻断肿瘤血供,同时对肿瘤细胞有良好的杀灭作用。然而 TACE 治疗栓塞材料选择<sup>[6]</sup>及其术后 VEGF 等产生增多<sup>[7]</sup>,可影响 TACE 远期疗效。VEGF 作为一种作用较强的促血管生成物质,其过表达可促进

肿瘤新生血管产生<sup>[8-9]</sup>。肝癌患者 VEGF 高表达,通过诱导肿瘤血管生成促进肿瘤生长、转移,在肝癌发生发展及预后中有相当重要的地位<sup>[10]</sup>。TACE 栓塞治疗使局部和周围残留肿瘤血管生成明显活跃,既往研究表明在肝癌中单次 TACE 导致暂时的 VEGF 过度产生,血清 VEGF 水平升高与未来远处转移有关<sup>[11-13]</sup>。因此,寻找一种新的介入栓塞模式并探索其机制及有效性已成为目前肝癌诊治热点。

载药微球是一种可负载抗肿瘤药物的新型栓塞材料,在肿瘤病灶中通过离子交换缓慢释放抗肿瘤药物,与碘化油相比可较长时间维持肿瘤局部药物浓度,从而实现较好的远期疗效<sup>[14-15]</sup>。载药微球创始人 Shinichi 等报道一项 HepaSphere 载药微球治疗肝癌前瞻性多中心开放标签临床试验研究,证实 HepaSphere 载药微球治疗富血管性肿瘤安全可行<sup>[16]</sup>。贝伐珠单抗通过抑制 VEGF 活性,使现存肿瘤血管发生退化、肿瘤新生血管形成得以抑制,从而抑制肿瘤生长<sup>[17]</sup>。Britten 等<sup>[18]</sup>报道 TACE 或联合静脉注射贝伐珠单抗治疗肝癌初步研究,结果表明 TACE 联合贝伐珠单抗治疗肝癌可行且可耐受,但疗效仍不十分理想。为控制肿瘤生长并取得较好疗效,本中心曾尝试在临床 TACE 术中应用载药微球加载贝伐珠单抗治疗 4 例难治性实体瘤,术后根据改良实体瘤疗效评价标准(mRECIST)评价显示其中有 1 例为部分缓解(PR),3 例为疾病稳定(SD),未发生严重不良反应;提示载药微球加载贝伐珠单抗治疗难治性实体瘤方法安全、效果肯定<sup>[19]</sup>。由于目前尚无载药微球加载贝伐珠单抗治疗肿瘤相关实验数据结果,本中心开展本次实验,旨在证实载药微球加载贝伐珠单抗介入栓塞后抗兔 VX2 肝癌血管生成的效果。本研究采用的方法原理及配比方法由载药微球创始人 Shinichi 教授及美国 Merit Medical Systems 公司提供。

研究表明血清和癌旁 VEGF 水平是评估肝癌预后的独立指标,通过检测术前、术后等不同时间段血清 VEGF 表达水平可显示 VEGF 动态变化<sup>[20]</sup>。为此,本研究检测静脉血清 VEGF,以评估载药微球加载贝伐珠单抗介入栓塞后抗兔 VX2 肝癌血管生成效果,结果表明 TACE 术后 1 d 3 组瘤兔血清

VEGF 水平均显著上调, 术后 7 d、14 d A 组血清 VEGF 与 B 组、C 组相比持续降低(可能与载药微球持续释放贝伐珠单抗相关), 提示该治疗方案与单纯载药微球治疗和栓塞微球联合贝伐珠单抗治疗相比可提高远期疗效; 术后 14 d A 组肿瘤体积、肿瘤增长率最低, 进一步说明载药微球加载贝伐珠单抗与其他两组相比可延缓肿瘤生长速度。

综上, 载药微球加载贝伐珠单抗 TACE 治疗可明显降低兔 VX2 肝癌模型术后血清 VEGF 水平和肿瘤增长率, 有望在临床应用中取得较好疗效。

### 〔参考文献〕

- [1] Daher S, Massarwa M, Benson AA, et al. Current and future treatment of hepatocellular carcinoma: an updated comprehensive review[J]. J Clin Transl Hepatol, 2018, 6: 69-78.
- [2] Tanigawa T, Hasuike Y, Akiyama Y, et al. Pre - operative treatment with transcatheter arterial chemoembolization (TACE) and hepatic arterial infusion (HAI) for liver metastasis from gastric cancer: a case report[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2015, 42: 1460-1462.
- [3] 徐国辉, 徐宗全, 周 峥, 等. TACE 联合贝伐珠单抗治疗不可切除结直肠癌肝转移的临床研究[J]. 实用癌症杂志, 2015, 30: 1493-1497.
- [4] 李静娴, 姜艳萍, 王家平, 等. 葡聚糖微球联合多西紫杉醇介入治疗原发性肝癌的临床疗效[J]. 实用放射学杂志, 2017, 33: 739-741.
- [5] 刘 嵘, 王建华, 周康荣, 等. 不同介入方法治疗兔 VX-2 肝肿瘤的实验研究[J]. 实用放射学杂志, 2001, 17: 561-564.
- [6] 杨 奎, 尹 君, 靳雪广, 等. 不同介入模式治疗肝癌的比较研究[J]. 临床放射学杂志, 2006, 25: 658-662.
- [7] 陈 卫, 邓 俊, 杨小娟, 等. 肝癌双灌注介入治疗后血清 TNF- $\alpha$ 、sIL-2R 以及 VEGF 水平的变化与预后相关[J]. 临床肝胆病杂志, 2010, 26: 203-204.
- [8] 兰 涛, 周国庆, 王桂华. 血管内皮生长因子与肝癌[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2014, 20: 212-214.
- [9] 万 健, 唐才喜, 冯 斌, 等. 原发性肝癌中 Numb 和 VEGF 的表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24: 39-44.
- [10] 张明明, 李 娜, 邹长鹏, 等. 抗血管生成药物治疗晚期肝癌的应用进展[J]. 河北医药, 2014, 36: 1064-1067.
- [11] 管清龙, 纪卫政, 任伟新, 等. 肝癌介入治疗后血清缺氧诱导因子和血管内皮生长因子含量变化对预后的影响[J]. 介入放射学杂志, 2014, 23: 142-146.
- [12] 贾中芝, 冯耀良, 施海彬. 原发性肝癌 TACE 前后血清 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 的相关性[J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7: 117-120.
- [13] Li Z, Xue TQ, Chen XY. Predictive values of serum VEGF and CRP levels combined with contrast enhanced MRI in hepatocellular carcinoma patients after TACE[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6: 2375-2385.
- [14] Gupta S, Wright KC, Ensor J, et al. Hepatic arterial embolization with doxorubicin-loaded superabsorbent polymer microspheres in a rabbit liver tumor model[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2011, 34: 1021-1030.
- [15] 金雪锋, 陈庆财, 宗在伟, 等. 载药肝动脉栓塞微球的发展现状[J]. 中国新药杂志, 2013, 22: 2268-2273.
- [16] Hiraki T, Koizumi J, Arai Y, et al. Transcatheter arterial embolization of hypervascular tumors with HepaSphere: prospective multicenter open label clinical trial of microspheres in Japan[J]. Jpn J Radiol, 2015, 33: 479-486.
- [17] 周振兴, 宋军民, 陈姬华, 等. 贝伐珠单抗在肿瘤治疗中的应用研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39: 525-532.
- [18] Britten CD, Gomes AS, Wainberg ZA, et al. Transarterial chemoembolization plus or minus intravenous bevacizumab in the treatment of hepatocellular cancer: a pilot study[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 16.
- [19] 于 奇, 吴 杰, 高 飞, 等. 载药微球加载贝伐珠单抗治疗难治性实体瘤 4 例[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28: 81-84.
- [20] Zhou J, Tang ZY, Fan J, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, 126: 57-61.

(收稿日期: 2020-02-25)

(本文编辑: 边 伟)