

·实验研究 Experimental research·

JX-594 和紫杉醇双层覆膜支架治疗兔食管鳞癌实验研究

方统磊, 肖钧元, 张一然, 朱悦琦, 程英升

【摘要】 目的 评价负载重组牛痘病毒 JX-594 和紫杉醇的覆膜金属支架对兔食管鳞癌模型的治疗作用。**方法** 通过手术将 VX2 肿瘤组织块种植于新西兰大白兔食管黏膜下层, 成功构建 VX2 兔食管鳞癌模型。食管 DSA 造影检查确认食管狭窄 $> 2/3$ 管腔直径, 作为支架置入适应证。将兔模型随机分为覆膜的紫杉醇负载金属食管支架 (PEMS) 组和双层覆膜的紫杉醇和 JX-594 共载金属食管支架 (PJEMS) 组, 每组 6 只。DSA 透视下支架输送器将支架置入食管狭窄病变部位。支架置入后 2 周处死实验兔, 分析 PEMS 和 PJEMS 治疗兔食管鳞癌的安全性和有效性。**结果** 支架置入术中两组各有 1 只兔窒息死亡, 术后 2 周内无死亡, 均未发生出血、穿孔及支架移位等并发症。两组各有 5 只荷瘤兔数据纳入统计学分析, 结果显示 PJEMS 组平均肿瘤体积为 $(1.286 \pm 0.463) \text{ cm}^3$, 明显小于 PEMS 组 $(5.014 \pm 2.082) \text{ cm}^3$ ($P < 0.05$); PEMS 组中 3 只实验兔出现远处转移, 其中 1 只为肺部弥漫性转移, PJEMS 组仅 1 只出现远处转移; PEMS 组、PJEMS 组兔体质量丢失分别为 $(0.334 \pm 0.084) \text{ kg}$ 、 $(0.162 \pm 0.177) \text{ kg}$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** JX-594 可增强紫杉醇对局部食管鳞癌生长的抑制作用, 更好地辅助食管支架治疗食管恶性狭窄, 也许可为晚期食管鳞癌临床治疗提供新的研究方向。

【关键词】 食管鳞癌; 食管支架; 紫杉醇洗脱金属支架; 紫杉醇和 JX-594 洗脱金属支架

中图分类号: R735.1 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2021)-05-0475-05

JX-594 and paclitaxel bilayer covered stent for esophageal squamous cell carcinoma: an experimental study in rabbits FANG Tonglei, XIAO Junyuan, ZHANG Yiran, ZHU Yueqi, CHENG Yingsheng. Department of Interventional Radiology, Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Corresponding author: CHENG Yingsheng, E-mail: chengyingsheng@hotmail.com

【Abstract】 Objective To evaluate the therapeutic effect of bilayer covered metal stent loaded with recombinant vaccinia virus JX-594 and paclitaxel in treating esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in experimental rabbits. **Methods** The rabbit models of VX2 ESCC were successfully established by surgically implanting VX2 tumor tissue block into the esophageal submucosa of New Zealand white rabbits. Esophageal stenosis exceeding $2/3$ lumen diameter confirmed by DSA esophagography was defined as the indication of stent implantation. The rabbit models were randomly divided into paclitaxel-loaded esophageal metal stent (PEMS) group and paclitaxel and JX-594 co-loaded esophageal metal stent (PJEMS) group, with 6 rabbits in each group. Under DSA fluoroscopic guidance and with the help of stent conveyor, the stent was placed into the stenotic site of the esophagus. All the experimental rabbits were sacrificed 2 weeks after stent implantation. The safety and efficacy of PEMS and PJEMS for the treatment of ESCC in experimental rabbits were analyzed. **Results** During stent implantation one rabbit in each group died of asphyxia. Within 2 weeks after stent implantation, neither death nor complications such as bleeding, perforation or stent displacement occurred in both groups. The experimental data of 5 experimental rabbits in each group were finally included in the statistical analysis. The mean tumour volume in the PJEMS group was $(1.286 \pm 0.463) \text{ cm}^3$, which was

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2021.05.012

基金项目: 国家自然科学基金(81571773)

作者单位: 200233 上海交通大学附属第六人民医院介入放射科

通信作者: 程英升 E-mail: chengyingsheng@hotmail.com

significantly smaller than (5.014 ± 2.082) cm^3 in the PEMS group ($P < 0.05$). In the PEMS group 3 rabbits developed distant metastases, one of which presented as diffuse pulmonary metastasis, while in the PJEMS group only one rabbit developed distant metastases. The average loss of body mass in the PEMS group and the PJEMS group was (0.334 ± 0.084) kg and (0.162 ± 0.177) kg respectively, the difference between the two groups was not statistically significance ($P > 0.05$). **Conclusion** JX-594 can enhance the inhibition effect of paclitaxel on the local growth of ESCC, which can effectively assist esophageal stent to alleviate malignant esophageal stricture. This therapeutic method may provide a new research direction for the clinical treatment of advanced ESCC. (J Intervent Radiol, 2021, 30: 475-479)

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma; esophageal stent; paclitaxel-eluting metal stent; paclitaxel and JX-594-eluting metal stent

中晚期食管癌患者常伴发食管恶性梗阻, 其中不可手术的食管癌患者 5 年生存率仅 15%~25%^[1]。载药食管支架可迅速缓解食管梗阻症状, 提高晚期食管癌患者生存质量。药物支架通过局部缓释化疗药物抑制肿瘤细胞生长, 减少系统性给药引起的全身不良反应, 甚至减慢癌症进程, 延长生存期。紫杉醇是许多侵袭性肿瘤包括食管癌在内的一线化疗药, 对食管鳞癌单药有效率达 28%^[2]。但有研究显示紫杉醇也可促进肿瘤新生血管生成, 并促进形成肿瘤转移微环境, 以协助乳腺癌细胞进入血循环; 紫杉醇还能在肺部形成免疫抑制性微环境, 使得乳腺癌细胞更易在肺部种植, 导致乳腺癌细胞肺转移^[3-4]。重组牛痘病毒 JX-594 是一种具有治疗作用的溶瘤病毒, 可特异性感染肿瘤细胞并在其内复制, 致使细胞裂解和死亡; 还能抑制癌细胞表面血管内皮细胞生长因子发挥功能的主要受体——酪氨酸激酶功能区受体(kinase domain receptor, KDR), 导致肿瘤血管闭合或破坏, 加速对癌细胞的杀伤作用^[5-6]。本研究研制载紫杉醇覆膜支架和共载 JX-594 和紫杉醇的双层覆膜支架, 并在兔食管鳞癌模型上评价 JX-594 和紫杉醇的抑瘤协同效果, 探讨 JX-594 是否可有效抑制肿瘤转移。

1 材料与方法

1.1 载药食管覆膜支架制备

以自扩张编织型金属食管支架(南京微创医学科技公司)为骨架, 紫杉醇为上载药物, 将紫杉醇与聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)共混, 通过高压静电纺丝技术实现支架表面快速均匀的覆膜与药物上载, 制得覆膜的紫杉醇负载金属食管支架(paclitaxel-loaded esophageal metal stent, PEMS); 将重组牛痘病毒 JX-594 与溶解后的甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA)共混, 均匀涂覆于 PEMS 表面, 利用蓝光交联技术实现其 PLGA 膜层外表面 GelMA 膜层

快速凝固成胶, 实现 JX-594 均匀上载, 制得双层覆膜的紫杉醇和 JX-594 共载金属食管支架(PJEMS)。经体外研究测试, 载 10% 紫杉醇的支架具有较好的释放性能和细胞毒性, 5 wt% GelMA 具有较好的降解性能, 且释放的 JX-594 仍保留生物活性。选取 10% 紫杉醇、5 wt% GelMA + JX-594 (107 pfu) 支架进一步研究。

1.2 VX2 兔食管癌移植瘤模型制备

新西兰大白兔(上海交通大学附属第六人民医院实验动物中心提供), 体质量 2~2.5 kg。VX2 肿瘤组织块于 -80℃ 冰箱取出, 按照快速复苏法复苏, 去上清液, 加 0.9% 氯化钠溶液漂洗, 手动离心, 重复 3 次后用眼科剪将组织块剪成 0.5~1.0 mm^3 大小, 保存于 0.9% 氯化钠溶液备用。兔禁食不禁水 24 h 后, 戊巴比妥 (1%, 3.0 mL/kg) 经耳静脉注射麻醉, 仰卧位固定于大动物手术台; 颈部术区备皮消毒铺单, 于环甲软骨下方偏左侧约 0.5 cm 处作约 2.0 cm 纵行切口, 暴露下颈段食管; 采用直视注射技术将制备好的肿瘤悬液注入食管, 具体操作: 用 1 mL 注射器针管抽吸带有肿瘤组织块的 0.9% 氯化钠溶液, 针管口朝下稍静置沉淀后使针管口处浓稠肿瘤组织体积达到约 0.2 mL, 连接 8 号针头, 针尖斜口朝外直视下行食管壁穿刺, 穿刺过程中调整针尖以确定穿刺部位为黏膜下层, 到达视野尽头时完成肿瘤组织块注射, 注射区食管壁快速呈现白色隆起证实穿刺注射成功; 拔针后, 用无菌棉签迅速按压针眼约 2 min, 确认无渗漏后关闭颈部切口并消毒。

术后实验兔继续禁食 24 h, 肌内注射青霉素 40 万 U/d, 连续 3 d。每 3~4 日监测食物摄入情况和体重, 每周食管造影观察食管腔狭窄情况。食管造影检查显示食管狭窄 > 2/3 管腔直径时, 将实验兔随机分配至 PEMS 组或 PJEMS 组。

1.3 食管造影

实验兔麻醉后头高尾低位(约 30°)仰卧于检查

床,DSA 透视监视下先经口咽部置入 6 F 造影导管,跨越肿瘤狭窄处到达胃腔,以防误入气管;透视下后撤导管至肿瘤接种处以上约 2 cm 处,匀速缓慢灌注碘对比剂,并旋转球管寻找最佳角度观察食管狭窄程度。

1.4 支架置入

同上步骤行食管造影确认肿瘤生长位置后撤出导管,经口咽部置入导丝直达胃腔,利用支架递送装置(南京微创医学科技公司)于食管狭窄部位释放支架,复查造影评估确认支架在位情况。

1.5 观察指标

观察两组实验兔支架置入后近期和远期并发症,包括瘘管、穿孔、出血、支架移位、食管再狭窄和手术相关死亡等,监测实验兔食物摄入和体质量丢失情况。支架置入后 2 周处死实验兔,具体步骤:经动物耳缘静脉注射戊巴比妥钠(1%,3 mL/kg),注射 20 mL 空气;完整取出食管,将支架从食管中取出,再纵向切开食管。测量食管肿瘤体积(V), $V=\text{长}\times\text{宽}\times$

高/2。检查肝、肺及胸、腹腔淋巴结转移等情况。

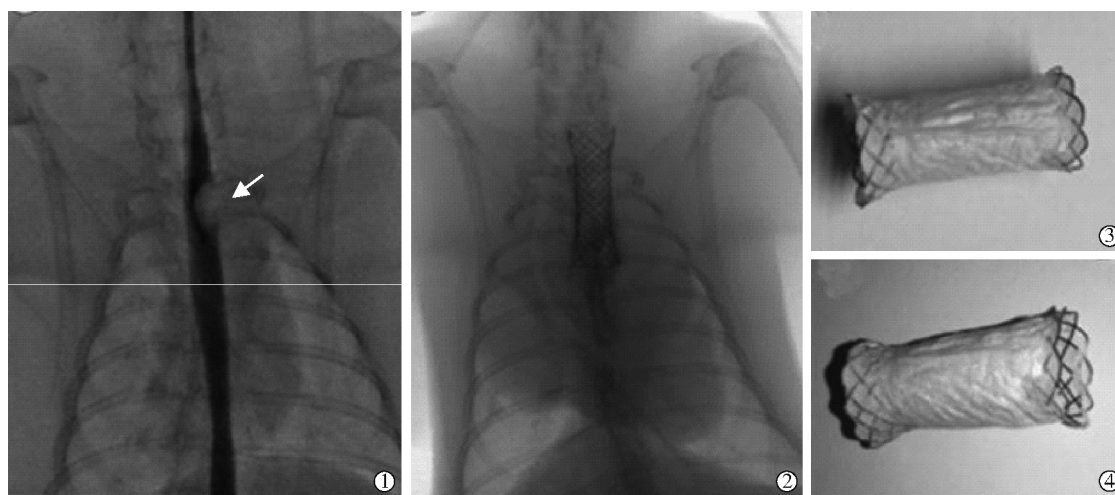
1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对研究数据进行统计学处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 兔食管鳞癌模型建立和随访情况

共 31 只新西兰大白兔接受经颈部外科手术食管鳞癌种植术。肿瘤 2~4 周后,观察到 17 只兔食管腔内肿瘤形成,且食管狭窄 $>2/3$ 管腔直径;选择其中 12 只荷瘤兔行支架置入实验,随机分成 PEMS 组($n=6$)和 PJEMS 组($n=6$),术后 DSA 影像见图 1。支架置入过程中两组各有 1 只兔窒息死亡,均无出血、穿孔等并发症发生。术后 2 周内,未见其他原因导致实验兔死亡。术后 2 周后兔处死时两组均未发生支架移位。两组各有 5 只荷瘤兔数据纳入统计学分析。



①食管造影(箭头指向食管狭窄即为肿瘤生长处);②支架置入后;③PEMS 支架;④PJEMS 支架

图 1 实验兔食管造影与支架置入

2.2 紫杉醇药物支架对食管鳞癌疗效分析

支架置入 2 周实验兔食管 DSA 造影随访结果显示,两组支架均在位,均出现明显的支架内再狭窄;取支架上端至胃底段食管,观察到支架形态明晰,与肿瘤对位良好,其中 PEMS 组有一只兔食管与支架下端接触处管壁变薄,有穿孔趋向,沿支架横向切开食管可见黏膜表面明显非肿瘤性增生从纤维膜未覆盖处嵌入支架腔内。

处死实验兔,对纳入统计分析的实验兔进行药物支架有效性评价,结果显示 PEMS 组、PJEMS 组平均肿瘤体积分别为(5.014 ± 2.082) cm^3 、(1.286 ± 0.463) cm^3 ,

差异有统计学意义($P<0.05$);两组均可见邻近气管受侵犯,未见胃底种植,远处转移主要累及肝脏、肺和淋巴结,转移发生率分别为 3/5、1/5,其中 PEMS 组 1 只兔为肺部弥漫性转移(图 2);PEMS 组、PJEMS 组支架置入 2 周后,兔体质量丢失分别为(0.334 ± 0.084) kg、(0.162 ± 0.177) kg,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

3 讨论

药物洗脱支架(drug-eluting stent, DES)在防止血管内再狭窄上的成功应用^[7-10]启发了其在非血管



图 2 PEMS 组 1 只实验兔出现弥漫性肺转移

表 1 支架置入 2 周后肿瘤大小与荷瘤兔体质量丢失情况

组别	体质量丢失/kg	肿瘤体积/cm ³
PEMS 组(n=5)	0.334±0.084	5.014±2.082
PJEMS 组(n=5)	0.162±0.177	1.286±0.463
P 值	0.085	0.040

管腔狭窄的研究与应用探索。一些研究陆续开展针对贲门支架置入后再狭窄难题^[11]及胆道、肠道恶性肿瘤支架治疗的研究与临床应用^[12-13]。然而 DES 在食管癌的应用,目前大多还局限于动物研究^[14-16]。可即刻缓解食管梗阻症状、微创及局部化疗以减少全身不良反应等优势,使得负载各种抗肿瘤药物的 DES,在食管恶性狭窄治疗中具有广泛的应用前景。相关 DES 动物实验和前瞻性临床研究亟待开展。紫杉醇是包括食管癌在内多种肿瘤的一线化疗药物,对食管鳞癌单药有效率达 28%^[2]。由于是脂溶性药物,紫杉醇易于渗透细胞膜,与支架被膜材料 PLGA 具有天然的高亲和力,该特性可确保负载于 PLGA 膜内的紫杉醇能长时间且稳定地释放,并在释放后快速进入细胞膜,保证在局部组织内发挥疗效所必需的药物浓度。另外,紫杉醇对支架置入后的反应性增生导致的再狭窄也有一定抑制效果^[17-18]。

溶瘤病毒疗法作为近年研究热点的肿瘤免疫疗法一重要分支,已逐渐被临床接受,截至目前已有 H101、Rigvir® 和 Imlygic®(talimogene laherparepvec) 等 3 种溶瘤病毒产品上市并用于头颈部和食管鳞癌^[19]及黑色素瘤^[20-21]治疗。此外,还有 CG0070(NCT 04452591、NCT01438112)、Toca511(NCT04105374、NCT02414165)、JX-594(NCT02562755)和 Reolysin(NCT01166542)等溶瘤病毒产品,均已进入治疗膀胱癌、肝癌和头颈部鳞状细胞癌等恶性肿瘤Ⅲ期临床试验研究阶段。溶瘤病毒与其他肿瘤免疫疗法相

比,具有杀伤效率高、靶向性好、不良反应小、多种杀伤肿瘤途径、避免耐药性和成本低廉等优势,有望成为继免疫检查点抑制剂后另一大突破。但溶瘤病毒自带的抗原性极易诱发机体产生中和抗体,这一特性决定了其难以实现系统给药而多以瘤内注射为主,大大限制了其应用。研究人员利用牛痘病毒自身细胞外包膜形式等独特特征,开发出 JX-594 系列产品,使其在中和抗体存在情况下仍可在血流中存活,从而使其能同时进行静脉注射和瘤内注射。但即使如此,也需要反复多次给药,才可实现可观的抑瘤效果^[22]。为了拓宽基因类药物制剂应用范围,有研究将表达肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的溶瘤腺病毒(oAd-TRAIL)包封在明胶水凝胶中,注射到荷瘤仓鼠皮下肿瘤内,20 d 后凝胶组肿瘤负荷与裸 oAd-TRAIL 组相比降低 61.2% ($P<0.01$);值得注意的是,凝胶组 6 只鼠中 1 只出现肿瘤完全消退,凝胶组生存率更高,说明 oAd-TRAIL 与裸 oAd-TRAIL 相比能诱导更有效的生长抑制,提高宿主存活率^[23]。刘云杰等^[24]报道将 TRADD 基因慢病毒涂于食管支架外覆膜上,研究其对犬食管良性狭窄的抑制作用,结果证实以支架为载体可成功地将 TRADD 基因慢病毒转染至食管黏膜组织中,抑制狭窄部位组织增生。但基因类药物在食管局部释放用于肿瘤治疗研究尚无先例。

本研究采用 GelMA 水凝胶负载 JX-594 作为外膜,联合负载紫杉醇的 PLGA 纤维膜一起合成双层载药覆膜包裹在金属支架外表面,治疗兔食管原位肿瘤模型后发现,共载紫杉醇和 JX-594 的双层覆膜对比单纯负载紫杉醇纤维膜在抑制肿瘤大小上具有显著优势,PJEMS 组兔平均肿瘤大小较单纯 PEMS 组大[(5.014±2.082) cm³对(1.286±0.463) cm³],差异有统计学意义($P<0.05$),但在抑制远处转移方面仅有轻微优势,尚未观察到显著获益,可能是受小样本量的影响,两组远处转移率差异无统计学意义。

本实验研究结果仍是初步的,仅简单比较了 PJEMS 组与 PEMS 组在肿瘤大小和远处转移上的差别,对于转移灶的确定也是组织取材肉眼识别后结合病理所证实,难免遗漏一些细小转移灶。下一步拟紧密结合影像学技术示踪肿瘤细胞,观察更微小肿瘤转移征象,为紫杉醇促进肿瘤转移、JX-594 抑制转移提供更可靠的证据,并对肿瘤局部微血管相关蛋白及肿瘤转移相关蛋白进行表征,进一步佐证 JX-594 和紫杉醇的协同作用。

[参考文献]

- [1] Domper Arnal MJ, Ferrandez Arenas A, Lanas Arbeloa A. Esophageal cancer: risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21: 7933-7943.
- [2] Chen Y, Zhu Z, Zhao W, et al. A randomized phase 3 trial comparing paclitaxel plus 5-fluorouracil versus cisplatin plus 5-fluorouracil in chemoradiotherapy for locally advanced esophageal carcinoma; the ESO-Shanghai 1 trial protocol[J]. Radiat Oncol, 2018, 13: 33.
- [3] Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, et al. Real-time imaging reveals local, transient vascular permeability, and tumor cell intravasation stimulated by TIE2hi macrophage-derived VEGFA [J]. Cancer Discov, 2015, 5: 932-943.
- [4] Chang YS, Jalgaonkar SP, Middleton JD, et al. Stress-inducible gene Atf3 in the noncancer host cells contributes to chemotherapy-exacerbated breast cancer metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114: E7159-E7168.
- [5] Breitbach CJ, Arulanandam R, De Silva N, et al. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans [J]. Cancer Res, 2013, 73: 1265-1275.
- [6] Karagiannis GS, Pastoriza JM, Wang Y, et al. Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism[J]. Sci Transl Med, 2017, 9: ean0026.
- [7] Holmes DR Jr, Leon MB, Moses JW, et al. Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis[J]. Circulation, 2004, 109: 634-640.
- [8] 倪 钧, 沈卫峰, 张建盛, 等. Firebird 药物洗脱支架治疗冠状动脉原发病变[J]. 介入放射学杂志, 2004, 13: 396-398.
- [9] 沈卫峰. 药物涂层支架在冠心病介入治疗中的临床应用[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2003, 2: 163-165.
- [10] 张大东, 冯小弟, 陈跃光, 等. 国产药物洗脱支架的临床应用[J]. 介入放射学杂志, 2005, 14: 236-238.
- [11] Zhu Y, Yang K, Cheng R, et al. The current status of biodegradable stent to treat benign luminal disease[J]. Mater Today, 2017, 20: 516-529.
- [12] Zhu Y, Edmonds L, Zhao X, et al. In vitro and in vivo evaluation of Rapamycin-eluting nanofibers coated on cardiac stents[J]. Rsc Adv, 2014, 4: 34405-34411.
- [13] Suk KT, Kim JW, Kim HS, et al. Human application of a metallic stent covered with a paclitaxel-incorporated membrane for malignant biliary obstruction: multicenter pilot study[J]. Gastrointest Endosc, 2007, 66: 798-803.
- [14] 杨 凯, 朱悦琦, 程英升. 食管良性狭窄药物镁合金可降解支架研究现状及展望[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 452-456.
- [15] Zhang Y, Ma L, Huang J, et al. The effect of paclitaxel-eluting covered metal stents versus covered metal stents in a rabbit esophageal squamous carcinoma model[J]. PLoS One, 2017, 12: e0173262.
- [16] Guo SR, Wang ZM, Zhang YQ, et al. In vivo evaluation of 5-fluorouracil-containing self-expandable nitinol stent in rabbits: efficiency in long-term local drug delivery[J]. J Pharm Sci, 2010, 99: 3009-3018.
- [17] Jeon SR, Eun SH, Shim CS, et al. Effect of drug-eluting metal stents in benign esophageal stricture: an in vivo animal study [J]. Endoscopy, 2009, 41: 449-456.
- [18] 王 红. 紫杉醇涂层球囊治疗冠脉支架术后再狭窄的现状[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21: 614-616.
- [19] Xia ZJ, Chang JH, Zhang L, et al. Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus[J]. Ai Zheng, 2004, 23: 1666-1670.
- [20] Sorokins V, Tilgase A, Olmane E, et al. A progressive stage III B melanoma treated with oncolytic ECHO-7 virus: a case report[J]. SAGE Open Med Case Rep, 2020, 8: 2050313X20934978.
- [21] Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma[J]. J Clin Oncol, 2015, 33: 2780-2788.
- [22] Kim JH, Oh JY, Park BH, et al. Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF[J]. Mol Ther, 2006, 14: 361-370.
- [23] Jung BK, Oh E, Hong J, et al. A hydrogel matrix prolongs persistence and promotes specific localization of an oncolytic adenovirus in a tumor by restricting nonspecific shedding and an antiviral immune response[J]. Biomaterials, 2017, 147: 26-38.
- [24] 刘云杰, 袁 月, 童珂雅, 等. 以支架为载体的 TRADD 基因慢病毒转染对食管良性狭窄的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37: 1806-1812.

(收稿日期: 2020-09-22)

(本文编辑: 边 皓)