

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00271

可显影硫酸钡海藻酸钠微球介入治疗兔 VX2 肝肿瘤

徐爱民^{1*}, 宋卫华¹, 龚少娟¹, 张树辉², 李铁军³, 吴孟超¹

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院介入三科, 上海 200438

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病理科, 上海 200438

3. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 研究硫酸钡海藻酸钠微球对兔 VX2 肝肿瘤的介入治疗作用。**方法:** 新西兰兔 24 只, 随机分为 3 组: 正常对照组(A 组, $n=5$)、肿瘤对照组(B 组, $n=10$)和介入治疗组(C 组, $n=9$)。介入治疗模拟人肝动脉插管方法。A、B、C 组于介入术后 7 d 行肝功能检查, B 组、C 组各 5 只动物于介入术后 2 周观察肿瘤质量、体积, 并行病理学检查, 包括常规 H-E 染色、CD34 及 VEGF 免疫组化检测; B 组 5 只、C 组 4 只动物观察生存期。**结果:** 介入治疗后 7 d, 丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平 B、C 组均高于 A 组($P<0.01$), 但 C 组 ALT、AST 数值低于 B 组($P<0.01$)。C 组肿瘤质量(2.434 ± 0.992) g, B 组(4.696 ± 1.246) g, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。C 组肿瘤体积(2.126 ± 0.929) cm^3 , B 组(3.962 ± 1.101) cm^3 , 差异具有统计学意义($P<0.01$)。病理学检查结果显示 C 组癌细胞大片坏死, CD34 染色大片坏死区无微血管, 残存的癌组织内新生血管明显减少, VEGF 表达仅见残存的癌细胞胞质呈弱阳性表达; 而 B 组癌巢大, 癌细胞丰富, CD34 染色可见丰富的新生血管, 癌细胞胞质可见丰富的 VEGF 表达。C 组生存期明显延长。**结论:** 硫酸钡海藻酸钠微球介入治疗兔 VX2 肝肿瘤安全可行; 能明显抑制肿瘤生长, 且对正常肝组织损伤小, 能延长实验兔生存时间。

[关键词] 海藻酸钠; 硫酸钡; 微球; VX2 肿瘤; 肝肿瘤; 介入治疗

[中图分类号] R 979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0271-04

Alginate-barium sulfate microspheres *via* vascular interventional procedures in treatment of VX2 tumor-bearing rabbits

XU Ai-min^{1*}, SONG Wei-hua¹, GONG Shao-juan¹, ZHANG Shu-hui², LI Tie-jun³, WU Meng-chao¹

1. No. 3 Department of Interventional Therapy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438

3. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To study the therapeutic effect of alginate-barium sulfate microspheres *via* transcatheter hepatic arterial infusion in treatment of liver VX2 tumors in rabbits. **Methods:** A total of 24 rabbits were randomly divided into 3 groups, with 5 rabbits in group A (normal control group); 19 rabbits implanted with liver VX2 tumors were further divided into 2 groups, with 10 rabbits in group B (tumor control group), and 9 in group C (therapy group). Rabbits in group C were catheterized with 3F microcatheter by Seldinger technique for interventional therapy. Spiral CT scanning was performed in group B and group C 14 days after implantation and 14 days after treatment. Liver function tests (TB, ALT, and AST) were performed before and 7 days after treatment. Five rabbits in group B and C were sacrificed to measure the tumor weight and volume; MVD and expression of CD34 and VEGF expression were examined by immunohistochemical technique. Survival periods of the animals were observed and animals were sacrificed 70 days after treatment. **Results:** Seven days after treatment, the ALT and AST in group B were significantly higher than those in group A and group C ($P<0.01$). Fourteen days after treatment, the average tumor weights in group C was significantly lower than that in group B ($[2.434\pm 0.992]$ g *vs* $[4.696\pm 1.246]$ g, $P<0.01$); and the tumor volume in group C was also significantly lower than that in group B ($[2.126\pm 0.929]$ cm^3 *vs* $[3.962\pm 1.101]$ cm^3 , $P<0.01$). Pathological examination showed large necrotic areas in the tumors in group C. CD34 stained necrotic area had no obvious microvessels. The angiogenesis was decreased greatly in the tumor tissues left. Weak

[收稿日期] 2008-08-27 **[接受日期]** 2008-11-14

[基金项目] 上海市科委基础重点项目(05JC14049). Supported by Grants for Basic Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(05JC14049).

[作者简介] 徐爱民, 博士, 副教授、副主任医师, 硕士生导师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875181, E-mail: xuarmy@163.com

VEGF expression was only found in the survived tumor cells. In contrast, group B had abundant cancer cells, large cancerous nests, abundant CD34 positive angiogenesis and strong cytoplasmic staining of VEGF. The survival of rabbits in group C was obviously longer than in group B. **Conclusion:** Treatment with alginate-barium sulfate microsphere *via* hepatic artery infusion is safe and feasible for treating liver VX2 tumor. Alginate-barium sulfate microspheres can obviously inhibit tumor growth and have less toxicity to the normal liver tissue.

[KEY WORDS] alginate; barium sulfate; microspheres; VX2 tumor; liver neoplasms; interventional therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3): 271-274]

微球作为介入栓塞材料治疗肿瘤疗效确切,微球制剂栓塞作用彻底持久、不易形成侧支循环^[1-4]。但作为肿瘤血管栓塞剂,其最大缺点就是缺乏 X 线透视的可视性,栓塞过程需借助造影剂,容易误栓塞。为此,本研究在前期研制成功可显影硫酸钡海藻酸钠栓塞微球的基础上^[1],采用介入方法治疗兔 VX2 肝脏肿瘤,观察这一自制阳性栓塞新剂型的可行性及抗肿瘤效果。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 自制中位直径 53 μm 的可显影硫酸钡海藻酸钠微球^[1]。VX2 肿瘤细胞株由第四军医大学唐都医院介入放射科惠赠。Arista™ 止血粉(阿里斯泰止血粉,美国 Medafor 公司,批号: M28851)。抗 CD34 单克隆抗体、抗 VEGF 多克隆抗体(Dako 公司)。EnVision System (K4006)购自 Dako 公司。影像设备:CT 机(GE Lightpeed QX/i);DSA(GE INNOVA 4100)。介入用设备和器械:3F PG 微导管(Progreat, Turomu, 日本),微导管直径 2.7 F(0.9 mm),微导丝外径 0.53 mm,造影剂为欧乃派克(Omnipaque, 300 mg/ml)。

1.2 动物分组 新西兰兔 30 只,雌雄不限,体质量 2.5~3.0 kg,由第二军医大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(沪)2002-0006;随机分为正常对照组(5 只)、肿瘤对照组(10 只)和介入治疗组(9 只)。

1.3 兔 VX2 肝脏肿瘤模型的建立 将 VX2 肿瘤细胞株常规复苏,制成 4 × 10⁹ 个/L 细胞密度的悬液。将 0.5 ml 悬液接种于兔后腿外侧肌肉内,2 周后即制成荷瘤兔。取活性瘤组织剪成小的瘤组织块,置于无菌生理盐水中备用。采用 VX2 肿瘤组织直接穿刺法制备肝脏肿瘤模型。穿刺道用 Arista 止血淀粉封堵。术后连续 4 d 肌注青霉素。

1.4 兔 VX2 肝肿瘤模型的介入治疗 介入治疗时间选择在接种后 2 周,模拟人肝动脉插管介入治疗方法进行。切开皮肤,暴露分离右股动脉,穿刺置入 3F 微导丝和微导管。导管于 T₁₂ 水平时造影(总量 4 ml,速率 1 ml/s)。用导丝在 T₁₂ 和 L₁ 椎体水平腹主动脉前壁寻找腹腔干动脉开口,导管跟导丝入腹腔

干动脉至肝总动脉后再造影(总量 3 ml,速率 1 ml/s)。超选肝动脉,注入硫酸钡海藻酸钠微球。介入治疗前及术后 2 周行肝脏 CT 扫描,观察肿瘤生长情况。

1.5 介入栓塞治疗疗效评价 实验兔介入术后 7 d 行肝功能检查(每组 5 只),检测项目为丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)和总胆红素(TB)。肿瘤对照组和介入治疗组各 5 只动物介入术后 14 d 被处死,测量肿瘤质量和体积,观察肿瘤生长情况,进行常规病理学和免疫组化检查;两组余下的动物继续观察生存期。标本用 10% 中性缓冲甲醛液固定,石蜡切片, H-E 染色。免疫组化采用 EnVision 二步法。CD34 阳性判断标准按 Weidner 方法。VEGF 阳性细胞为细胞质出现浅黄色、棕黄色或棕褐色颗粒, >10% 为阳性表达。

2 结果

2.1 介入治疗后 7 d 对照组和介入治疗组肝功能指标比较 介入治疗后 7 d,肿瘤对照组 ALT、AST 指标明显高于正常对照组($P < 0.01$),显示了肿瘤生长对肝功能的损害;而介入治疗组 ALT、AST 数值明显低于肿瘤对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),显示介入治疗在一定程度上可保护肝功能(表 1)。

表 1 肝功能指标的变化

Tab 1 Liver function parameters of each group

(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Group	TB	ALT	AST
Normal control	0.75 ± 0.06	32.4 ± 8.0	20.7 ± 9.0
Tumor control	0.90 ± 0.32	65.8 ± 14.0**	50.7 ± 12.8**
Therapy	0.75 ± 0.13	41.8 ± 10.7**△	37.5 ± 13.5**△

** $P < 0.01$ vs normal control group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs tumor control group

2.2 介入治疗后 14 d 对照组和介入治疗组肿瘤质量和体积比较 介入治疗组肿瘤质量(2.434 ± 0.992) g,对照组(4.696 ± 1.246) g,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。介入治疗组肿瘤体积(2.126 ± 0.929) cm³,对照组(3.962 ± 1.101) cm³,差异具有

统计学意义($P < 0.01$)。结果显示了介入治疗对肿瘤生长的明显抑制作用。

2.3 病理结果

2.3.1 肉眼观察 兔肝肿瘤外观呈灰白色,质地较硬,无明显的包膜形成,切面呈鱼肉状,肿瘤直径超过 2 cm 时其中心出现灶性坏死。

2.3.2 H-E 染色 肿瘤对照组癌组织呈浸润性生长,癌巢大,细胞丰富,排列紧密,细胞体积较大,坏死腔不明显(图 1A)。介入治疗组可见癌组织的形态为癌巢小,细胞相对稀少,细胞排列明显松散,细胞分界清,癌细胞核固缩和核碎裂现象明显增多、核染色质浓缩、细胞体积缩小,并可见多个片状或灶性

坏死(图 1B)。

2.3.3 CD34 表达 微血管被肿瘤细胞分割,呈点状分布,微血管之间无沟通或微血管两边有点状型微血管,中间狭长,呈线状。肿瘤对照组癌巢区微血管数目较多(图 1C)。介入治疗组:癌组织大片坏死,残存的癌组织内新生血管明显减少(图 1D)。

2.3.4 VEGF 表达 VEGF 定位于肿瘤细胞质及胞膜,阳性表达为胞质或胞膜染为棕黄色,呈弥漫或散在的颗粒状。肿瘤对照组癌细胞胞质可见丰富的 VEGF 表达(图 1E)。介入治疗组残存癌细胞胞质可见弱阳性的 VEGF 表达,坏死较彻底的肿瘤细胞无 VEGF 的表达,癌旁肝组织无表达(图 1F)。

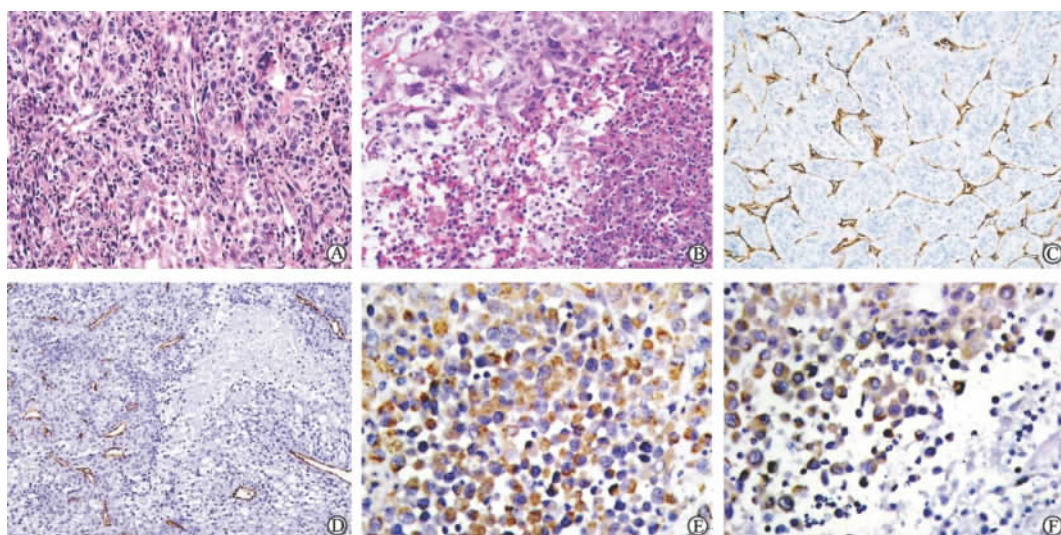


图 1 肿瘤对照组(A、C、E)及介入治疗组(B、D、F)动物病理学观察结果

Fig 1 Pathological characteristics of tumor control (A, C, E) and interventional treatment (B, D, F) groups

A, B: H-E staining. Original magnification: $\times 200$. C, D: CD34, EnVision staining. Original magnification: $\times 400$. E, F: VEGF, EnVision staining. Original magnification: $\times 400$. A: Tumor control group with obvious pleomorphic and mitosis of cancer cells; B: Interventional therapy group with obvious unclear pyknosis, fragmentation and necrosis with a sheet distribution of cancer cells; C: Tumor control group with rich neovascularization in tumor tissues; D: Interventional therapy group with decreased neovascularization in the residual cancer tissue; E: Tumor control group with stronger granular VEGF staining in cancer cells; F: Interventional therapy group with weaker VEGF expression in the residual cancer cells compared with tumor control group

2.4 生存期及肿瘤生长观察 对照组 5 只动物生存期分别为 39、43、46、53、55 d;介入治疗组 4 只动物中 2 只生存期分别为 60 d 和 68 d,另 2 只 70 d 时仍存活。对照组动物死亡后尸检发现肝肿瘤直径均大于 4 cm,但大部分肿瘤组织已经坏死、液化致肿瘤囊性改变。动物死亡前不进食,体质量减轻,无活力。

2.5 影像学表现 结果表明,该微球在 X 线透视下显影良好,有多个结节浓聚(图 2A)。介入治疗后 2 周 CT 扫描显示,微球大量聚集于移植瘤内,不仅栓塞效果良好,而且具有极高的 X 线衰减(图 2B)。

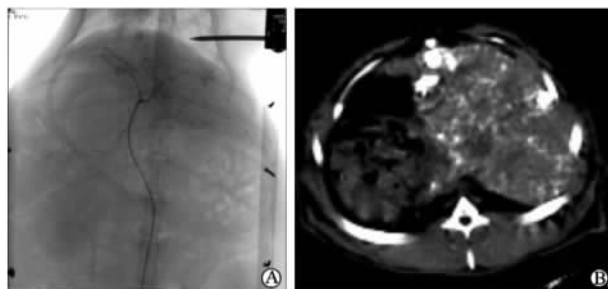


图 2 微球影像学表现

Fig 2 Imaging characteristics of microspheres

A: Transarterial infusion of alginate-barium sulfate microspheres; B: Spiral CT scans were performed 14 days after interventional treatment and CT image showed homogeneous microspheres accumulation in tumors

3 讨论

肝癌的介入治疗中,目前最常用的栓塞剂是碘化油。它也是目前使用的栓塞剂中唯一真正意义上的阳性栓塞剂(X线透视下可视),而其余各种栓塞剂,如明胶海绵、颗粒性栓塞剂(微球)、中药类栓塞剂等均为阴性栓塞剂。碘化油是黏滞性液体栓塞剂,有其使用上的优点,但也有缺点。普通碘化油黏度较高,使用不方便;超液化碘油常不能充分、全部积聚于肝癌病灶内,且容易被清除,影响栓塞效果^[2]。

颗粒性栓塞剂是人们努力的一个方向。近年来,随着天然或人工合成的高分子化合物在医学领域应用研究的深入,人们的思路逐渐转向了将颗粒性栓塞剂微粒化,做成微球制剂来栓塞微血管。当微球直径为50~150 μm ,可栓塞到管径与之直径相等的微动脉内,栓塞位点在肝内动脉吻合支水平以远,至肝窦前小动脉水平,侧支循环不易形成。王杰等^[3]运用葡聚糖微球肝栓塞治疗肝癌,可达直径100 μm 的微动脉水平,191 d后被栓血管微球仍未被吸收,也未见再通现象,门静脉内未见微球栓子存在。

近年来开发的海藻酸钠是从海洋的褐藻中提取的直链阴离子多糖,是一新型无毒、生物相容性好、可生物降解的天然高分子材料,具有较好的成膜及成塑性,近年来已被应用于细胞、药物载体领域^[4-6]。1980年Lim等^[7]首创用海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠(A-P-A)制成的微球包裹胰岛进行同种鼠胰岛移植获得成功,但直到最近才被真正作为微球化免疫隔离方法,受到国内外研究者关注^[8-10]。微球化人工细胞治疗疾病的研究,为解决组织细胞移植中的免疫排斥反应和移植来源稀少的难题提供了新的途径,海藻酸钠微球的使用取得了很大进步。

我们前期采用海藻酸钠来制备微球,并用此微球包覆硫酸钡,克服了微球制剂不具有X线可视性的缺陷^[1]。本研究利用自制的阳性海藻酸钠栓塞微球,控制微球中位直径53 μm ,采用介入方法治疗兔VX2肝脏肿瘤,观察这一阳性栓塞新剂型的可行性及抗肿瘤效果。结果表明,该微球在X线透视下显影良好;介入治疗后2周CT扫描显示,微球大量聚集于移植瘤内,不仅栓塞效果良好,而且具有极高的X线衰减。介入治疗术后2周,介入治疗组肿瘤生长受到明显抑制,肿瘤质量和体积均小于对照组($P<0.01$)。病理学检查可见介入治疗组癌细胞大片坏死,细胞核固缩、碎裂明显。CD34染色显示介

入治疗组大片坏死区无微血管,残存的癌组织内新生血管明显减少,而对照组癌组织间见丰富的新生血管。VEGF表达显示,介入治疗组仅见残存的癌细胞胞质弱阳性表达,明显低于对照组。该微球介入治疗后对实验动物的肝功能有一定损害,与正常组对比,ALT、AST升高($P<0.01$),但仍明显低于肿瘤对照组($P<0.01$)。介入治疗明显抑制了肿瘤生长,因此介入治疗组实验兔的生存期明显延长,对照组植瘤55 d后无一只兔存活,而介入治疗组生存均长于60 d。

综上所述,自制的包裹硫酸钡的海藻酸钠微球,不仅在X线下有良好的显影,对实验兔肿瘤的介入治疗也表明能对肿瘤生长起到明显抑制作用,延长动物生存期。

[参考文献]

- [1] 龚纯贵,王新霞,唐洁,徐爱民. 可显影固体栓塞剂硫酸钡海藻酸钠微球的研制[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 833-836. Gong C G, Wang X X, Tang J, Xu A M. Preparation of X-ray developable alginate-barium sulfate microspheres as material for embolic agent[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29: 833-836.
- [2] 杨立,夏东州,张铁汉,王力非,邢冲冲. 肝癌栓塞治疗中碘化油特点的应用研究[J]. 临床放射学杂志, 2000, 19: 313-316.
- [3] 王杰,王学浩,冯耀良,李麟荪,钱建民,张峰,等. 葡聚糖微球肝栓塞治疗肝癌疗效的病理学评估[J]. 临床肝胆病杂志, 2002, 18: 316-318.
- [4] 李沙,侯新朴. 海藻酸钠-壳聚糖微囊成型机理及其对大分子药物的载药、释药研究[J]. 药学报, 2003, 38: 380-383.
- [5] 聂淑芳,吴学明,刘宏飞,姜华威,潘卫三. 海藻酸钠骨架材料中药物释放的影响因素[J]. 药学报, 2004, 39: 561-565.
- [6] Bajpai S K, Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions[J]. React Funct Polym, 2004, 59: 129-140.
- [7] Lim F, Sun A M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas[J]. Science, 1980, 210: 908-910.
- [8] Haque T, Chen H, Ouyang W, Martoni C, Lawuyi B, Urbanska A M, et al. *In vitro* study of alginate-chitosan microcapsules: an alternative to liver cell transplants for the treatment of liver failure[J]. Biotechnol Lett, 2005, 27: 317-322.
- [9] Taqieddin E, Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules[J]. Biomaterials, 2004, 25: 1937-1945.
- [10] Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen P J, Manz B, Katsen A, et al. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation[J]. J Mater Sci Mater Med, 2005, 16: 491-501.

[本文编辑] 贾泽军