

• 实验研究 •

经动脉灌注纳米微粒治疗兔肝 VX2 肿瘤的实验研究

关键, 胡道予, 孙振纲, 杨国华

【摘要】 目的:研究羟基磷灰石纳米微粒(nHAP)对兔肝 VX2 肿瘤的治疗作用。**方法:**将成功接种肝 VX2 肿瘤的模型兔随机分成 3 组, 每组 15 只, 用显微外科手术临时阻断肝总动脉血流, 经胃十二指肠动脉插管给药行介入治疗, 术毕结扎胃十二指肠动脉。A 组为生理盐水组(对照组), 注射生理盐水 5 ml; B 组为碘油组(疗效对比组), 注射超液化碘油 0.5~1.0 ml; C 组为 nHAP 组, 注入 0.5% nHAP 0.5~1.0 ml。3 组实验动物分别于治疗前、治疗后 7、14 天行多层螺旋 CT 肝脏扫描, 测量肿瘤的大小, 并计算肿瘤生长率。治疗前, 治疗后第 1、7 天测血清天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT); 记录各组术后生存天数。**结果:**术后 7、14 d, A 组动物的肿瘤生长率分别为 $(350 \pm 116)\%$ 和 $(1098 \pm 337)\%$, B 组为 $(234 \pm 18)\%$ 和 $(730 \pm 32)\%$, C 组为 $(233 \pm 15)\%$ 和 $(723 \pm 30)\%$ 。B、C 两组与 A 组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), B 组与 C 组相比差异无意义($P > 0.05$)。术前各组血清 AST、ALT 水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 术后 1 天, A、B、C 组血清 AST、ALT 均升高, B、C 组上升幅度稍高, 但与 A 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后 7 天, 各组 AST、ALT 均降至正常范围。A、B、C 组瘤兔的生存期分别为 (38.0 ± 5.4) d、 (54.0 ± 8.1) d、 (56.0 ± 8.2) d, B、C 两组与 A 组相比生存期明显延长($P < 0.05$)。**结论:**经动脉灌注 nHAP 治疗兔肝 VX2 肿瘤能有效抑制肿瘤生长, 延长瘤兔的生存期, 而无明显肝功能损害。

【关键词】 羟基磷灰石纳米; 兔; 肝肿瘤; 实验, 模型; 放射学, 介入性

【中图分类号】 R815 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2007)08-0786-04

Effect Evaluation and MSCT Study of Interventional Therapy with Hydroxyapatite Nanoparticle on Hepatic Tumor of Rabbits Bearing VX-2 Tumor GUAN Jian, HU Dao-yu, SUN Zhen-gang, et al. Department of Radiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, P. R. China

【Abstract】 Objective: To study the effects of hydroxyapatite nanoparticle (nHAP) on hepatic tumor of rabbits bearing VX-2 tumor. **Methods:** 45 rabbits implanted liver VX2 tumors were randomly divided into 3 groups. Each group had 15 rabbits. All the rabbits were proved to have liver neoplasmas by MSCT. During the open laparotomy, common hepatic artery was ligated temporarily, and then a catheter was inserted via gastroduodenal artery under microscope. Administration of medicine was given to the rabbits. Group A (control group) was administered with 0.5 to 1.0 ml saline; Group B (lipiodol group) was administered with 0.5 to 1.0 ml; Group C (nHAP group) was administered with 0.5 to 1.0 ml. Multislice spiral CT scan was performed to measure tumor volume on the 7th day and 14th day after treatment. The serum levels of AST and ALT were measured on the 1st day and 7th day after treatment. The survivals of VX2 rabbits were also recorded. **Results:** The tumor growth rates of group B and C on the 7th days and 14th day after treatment were smaller than those of the control group ($P < 0.05$). The tumor growth rates between group B and C on the 7th day and 14th day after treatment were similar ($P > 0.05$). The life spans of both group B and group C were longer than that of the control group ($P < 0.05$). The serum levels of AST and ALT in all groups were slightly higher on the 1st day after treatment than before treatment ($P > 0.05$). The serum levels of AST or ALT in all groups became normal on the 7th day after treatment. **Conclusion:** The interventional therapy with nHAP has significant inhibitory effect on hepatic tumor of rabbits bearing VX-2 tumor, and can prolong the life span of these rabbits. There are no obvious liver toxicity by using the interventional therapy.

【Key words】 Hydroxyapatite nanoparticle; VX2; Liver tumor; Rabbits

纳米技术在肿瘤学方面的应用已成为目前关注的焦点, 体外实验中发现羟基磷灰石纳米(nan hydroxyapatite particle, nHAP)对多种癌细胞增殖具有抑

制作用, 而对正常细胞生长影响甚小^[1-4]。本研究以兔肝 VX2 肿瘤为模型, 通过经动脉介入治疗, 观察 nHAP 在机体内对兔肝 VX2 肿瘤的抑制作用。

材料与方法

1. VX2 肝癌模型制作

重 2.0~2.5 kg 新西兰大白兔 50 只(华中科技大

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科(关键、胡道予), 肝脏外科中心(孙振纲、杨国华)

作者简介: 关键(1977-), 男, 广东开平人, 博士研究生, 主要从事腹部影像诊断和介入治疗工作。

基金项目: 国家“十五”重点科技攻关资助项目(2004BA714B)

学同济医学院实验动物中心提供);荷 VX2 瘤新西兰种兔 1 只。取荷 VX2 瘤新西兰种兔后大腿深部肌肉内 VX2 瘤,制成 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 的小组织块备用。按 $0.10 \sim 0.15 \text{ ml/kg}$ 的剂量肌注速眠新(长春军需大学兽医研究所)麻醉种植兔,采用开腹瘤块包埋发法将 VX2 瘤接种至实验兔^[5]。

2. 实验分组

种植后养殖 2 周行多层螺旋 CT(multislice spiral CT, MSCT)检查,显示肿瘤全部种植成功,从中选取肿瘤直径达 1 cm 左右者 45 只,分为 3 组,每组 15 只, A 组为生理盐水组(对照组),注射生理盐水 $0.5 \sim 1.0 \text{ ml}$; B 组为碘油组(疗效对比组),注射超液化碘油 $0.5 \sim 1.0 \text{ ml}$; C 组为 nHAP 组,注入 0.5% nHAP(武汉理工大学提供) $0.5 \sim 1.0 \text{ ml}$ 。

3. 显微镜下插管经胃十二指肠动脉介入治疗^[6]

术前一日实验兔禁食、禁水。将兔麻醉后上腹部备皮,取仰卧位固定于兔台,经耳缘静脉建立输液通道,予抗生素盐水静脉滴注。消毒铺巾后,取上腹部正中切口,逐层切开打开腹膜腔,暴露肝脏和胃。离断肝胃韧带后分离肝总动脉和胃十二指肠动脉,胃十二指肠动脉其远端(近胃侧)结扎,近端(近肝侧)穿线作牵引,肝总动脉作临时结扎。在显微镜下,提起胃十二指肠动脉近端牵引线,用小针头扎破胃十二指肠动脉前壁,以显微镊将充盈了肝素的置入自制微导管,经破口送入胃十二指肠动脉内约 $0.5 \sim 1.0 \text{ cm}$,结扎牵引线固定导管,插管后应观察回血,确定导管在胃十二指肠动脉内后给药,注射完毕后拔管,结扎胃十二指肠动脉,并使肝总动脉血流再通。逐层缝合后关腹,包扎。术后肌注抗生素 3 天。

4. MSCT 检查和肝功能评价

采用 GE prospeed 16 层螺旋 CT 机, 120 kV, 150 mA, 行 1.25 mm 薄层扫描,扫描范围自膈顶至肝下缘。增强扫描经耳缘静脉注射对比剂(优维显 300 mg I/ml),快速手推完成,总量 $2 \sim 3 \text{ ml}$ 。扫描时实验兔需麻醉,以免移动影响图像质量。术前 MSCT 评价 VX2 瘤的种植和生长情况,术后 7 天和第 14 天观察肿瘤情况,并测量体积和计算肿瘤生长率。公式如下:

$$V = \frac{ab^2}{2}$$

V 为估计体积, a 为肿瘤最大径, b 为肿瘤最小径。

$$\text{生长率} = \frac{\text{治疗后肿瘤体积} - \text{治疗前肿瘤体积}}{\text{治疗前肿瘤体积}} \times 100\%$$

治疗前,治疗后第 1、7 天抽耳缘静脉血测天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT),并记录各组术后生存天数。

5. 统计学分析

所有数据以均数加标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 统计软件包分析处理数据,组间比较采用方差分析,术前及术后比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

MSCT 表现:治疗前 CT 平扫可见肝内圆形或类圆形低密度灶,边界尚清,增强后肿瘤实质强化不明显,可见边缘强化或中心更低密度坏死区,与正常肝组织分界更清晰。治疗后 A 组(生理盐水对照组)和 C 组(nHAP 组)表现基本与治疗前类似,但出现肿瘤体积增大,中心坏死区扩大等改变;治疗后 B 组(碘油组)平扫可见肿瘤区域内高密度的碘油沉积,增强后瘤灶显示为低密度,边界较清楚,周边见点片状碘油沉积(图 1、2)。

各组瘤兔肿瘤大小变化及生长率见表 1。治疗前各组瘤兔的肿瘤体积差异无统计学意义($t_{AB} = 0.019$,

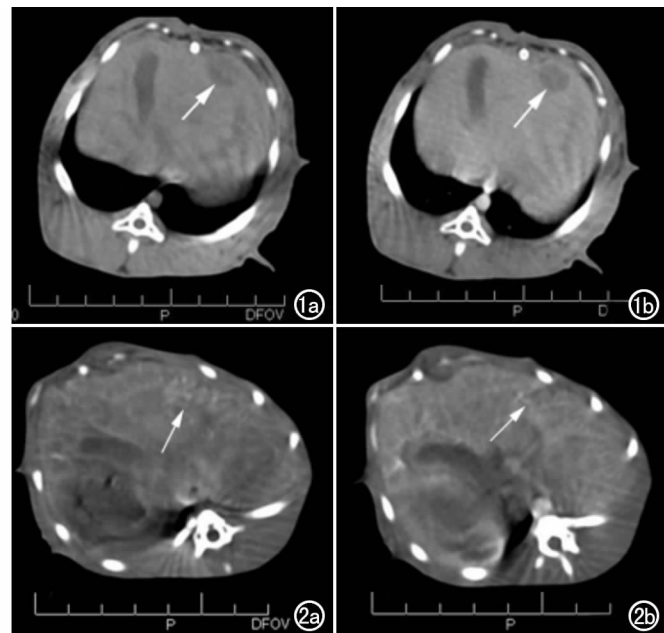


图 1 a) C 组术后 7 天, MSCT 平扫示兔肝左叶近包膜下 VX2 瘤呈类圆形低密度,边界尚清楚; b) 增强后病灶仍呈低密度,且瘤灶更明显,直径约 1.1 cm 。图 2 a) B 组术后 7 天, MSCT 平扫示兔肝左叶 VX2 瘤呈类圆形低密度影,边界不甚清楚,周边见较多点片状碘油沉积,肝内也可见少许碘油沉积; b) 增强后肝实质强化明显,瘤灶显示为低密度,边界变得较清楚,周边见点片状碘油沉积,肝内瘤灶直径约 1.1 cm 。

$t_{AC}=0.028, t_{BC}=0.010, P>0.05$)。术后 7 和 14 天, B、C 两组肿瘤体积和生长率都小于 A 组(生理盐水对照组), 差异有显著性意义($t_{AB}=2.615, t_{AC}=3.091, P<0.05$), B 组与 C 组之间无明显差异($t_{BC}=0.021, P>0.05$)。

各组瘤兔生存时间 A、B、C 三组瘤兔生存期分别为(38.0 ± 5.4) d、(54.0 ± 8.1) d 和(56.0 ± 8.2) d。B 和 C 组与 A 组相比生存时间明显延长, 差异有统计学意义($t_{AB}=6.365, t_{AC}=7.101, P<0.05$), B 组与 C 组相比差异无统计学意义($t_{BC}=0.672, P>0.05$)。

各组瘤兔治疗前后血清 AST、ALT 水平见表 2。治疗前三组血清 AST、ALT 均正常。治疗后 1 天, 生理盐水对照组、碘油组、nHAP 组血清 AST、ALT 均稍升高, 但在正常范围内。治疗后 7 天呈下降趋势, 逐渐接近治疗前水平。

讨 论

人工合成的无机纳米粒子——nHAP 具有高表面积、组织相容性、多孔性、吸附性等理化性质特点, 可作为载体运送抗生素、蛋白、激素、抗肿瘤药物等到达靶器官, 提高药物在靶器官的浓度, 延长靶器官的有效药

物浓度时间, 同时减少血液中循环的药物浓度及由此引起的不良反应, 达到靶向治疗的目的^[7,8]。1992 年, Aoki^[9]将 nHAP 作为抗癌药物的载体, 在进行体外细胞培养的实验中意外发现, 用作空白对照的 nHAP 微晶对癌细胞增殖有明显的抑制作用。随后, 一些研究者在体外实验中发现 nHAP 对多种癌细胞的增殖具有抑制作用, 而对正常细胞生长影响甚小。nHAP 作为新型的材料, 已经用于口腔科、眼科及骨科的临床治疗, 主要作为人体修复材料使用, 其抗肿瘤特性的应用尚处于研究阶段。

在本研究的预实验中笔者用电镜对 nHAP 的特性和抗肿瘤作用进行了初步分析, 经动脉灌注 nHAP 后, 见 nHAP 聚集于兔肝 VX2 肿瘤细胞, 并见肿瘤细胞坏死(图 3)。本研究显示 nHAP 经胃十二指肠动脉灌注给药治疗兔肝 VX2 肿瘤, 与对照组相比, 肿瘤增长明显减慢, 瘤兔存活期延长, 可见 nHAP 对兔肝 VX2 肿瘤生长具有一定抑制作用。将经典的肝癌介入治疗药物超液化碘油作为疗效对照, 两者效果类似。体外实验表明^[2-4] nHAP 抑制癌细胞增殖的机制可能有: ①nHAP 粒径为 20 nm 左右, 有较好的单分散性, 在治疗肝脏肿瘤时发挥靶向作用; ②提高肿瘤细胞内

表 1 三组瘤兔肿瘤大小变化及生长率情况

组别	体积(cm^3)			生长率(%)	
	治疗前	治疗 7 天	治疗后 14 天	治疗后 7 天	治疗后 14 天
A 生理盐水组(对照组)	1.38 ± 2.45	4.84 ± 1.64	15.16 ± 2.46	350 ± 116	1098 ± 337
B 碘油组(疗效对比组)	1.36 ± 2.38	3.19 ± 3.57	9.92 ± 5.80	234 ± 18	730 ± 32
C nHAP 组	1.35 ± 2.35	3.27 ± 3.64	9.87 ± 4.82	233 ± 15	723 ± 30

表 2 三组瘤兔治疗前后血清 AST 及 ALT 的变化情况 (U/L)

组别	AST			ALT		
	治疗前	治疗后 1 天	治疗后 7 天	治疗前	治疗后 1 天	治疗后 7 天
A 生理盐水组(对照组)	22 ± 6.31	28 ± 4.13	28 ± 2.72	23 ± 4.71	27 ± 4.63	29 ± 5.13
B 碘油组(疗效对比组)	23 ± 5.72	33 ± 6.76	29 ± 4.17	23 ± 4.34	27 ± 5.12	26 ± 4.73
C nHAP 组	24 ± 6.18	37 ± 7.56	30 ± 6.15	24 ± 5.89	34 ± 8.13	29 ± 4.96

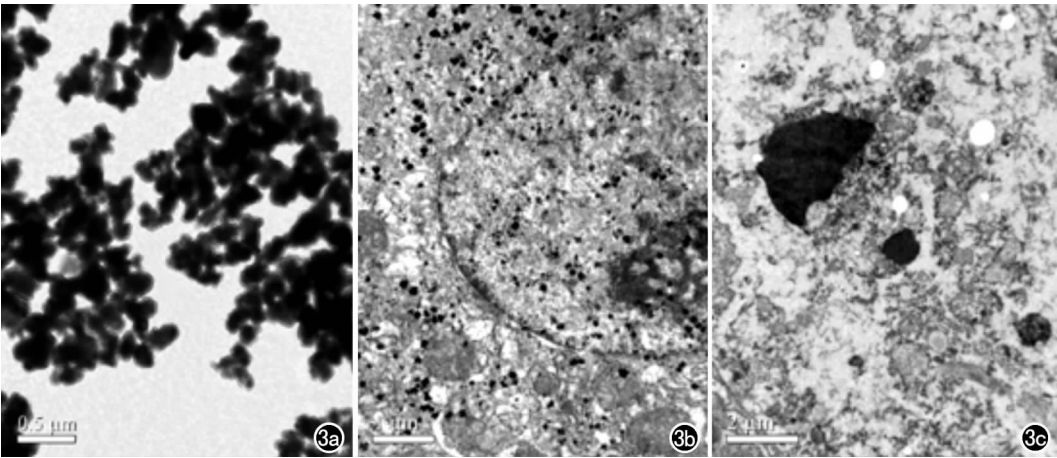


图 3 a) 超声分散 10min 后透射电镜示 nHAP 微粒; b) 经动脉灌注 nHAP 30min 后, 透射电镜示兔肝 VX2 肿瘤细胞内见 nHAP 沉积于胞浆和核; c) 透射电镜示兔肝 VX2 肿瘤细胞坏死, 见核碎裂。

钙离子浓度,从而激活 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶,使 DNA 发生降解并导致细胞程序性死亡(即凋亡);③阻止肿瘤细胞进行有丝分裂,阻碍了细胞周期进程;④抑制肿瘤细胞端粒酶基因表达,下调端粒酶活性实验证明纳米粒子能特异并高效地与肿瘤新生血管的内皮细胞结合,从而抑制肿瘤细胞生长。⑤ nHAP 明显抑制人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长、增殖,进入到癌细胞内改变细胞质的微环境,使 Bel-7402 细胞阻滞于 G_1 期,影响细胞周期进展,导致癌细胞胀亡。

兔 VX2 肝癌为移植性富血供肿瘤,主要为肝动脉供血,与人类原发性肝细胞癌类似;肿块为巨块型实体瘤,呈浸润性生长,模型制作简便,超声和 CT 能准确观察肿瘤的生长和转移情况,是用作介入治疗理想的动物模型^[5,10]。本研究利用显微手术的方法经胃十二指肠动脉插管行术中介入治疗,实现超选择给药的同时,方法上具有以下特点:①显微镜直视下操作,解剖结构清楚,视野清晰;②结扎胃十二指肠动脉远端后插管给药,避免药物反流;③未破坏肝脏供血血管,肝脏血流动力学影响较小。采用 MSCT 薄层加增强扫描,在治疗前可以较准确地选择肿瘤条件接近的实验兔,减少了实验偏倚;治疗后 MSCT 扫描使得肿瘤的生长状况评估更为细致,体积测量更精准,进一步提升了实验的科学性;此外,MSCT 扫描速度快,实验兔不必行深度麻醉,随访方便。

依据主要肝功能监测指标 AST、ALT 的结果,本文所采用的治疗方法并无明显肝功能损伤的表现。术后各组出现的一过性 AST、ALT 的升高可能是手术操作、机体应激状态、术中肝动脉短暂阻断致肝组织缺血和药物作用于肿瘤的共同反应。与对照组相比,实验组未出现明确与 nHAP 相关的并发症。有学者^[11]向家兔静脉注射 nHAP 粒子研究其对药物的反应,结果显示纳米 nHAP 在家兔无明显蓄积毒性,当用量远小于最小致死剂量时,纳米 HAP 可作为药物载体,甚至可能作为一种新型的抗癌药物,经静脉安全应用。

本实验由于条件所限,并未对肝功能的各项指标进行全面监测,随访时间也有限,对给药后 nHAP 在主要脏器中的分布和影响也未纳入研究。

分析 nHAP 经动脉灌注治疗移植性兔肝癌的实验结果,可初步认定 nHAP 具有抑制肿瘤生长和延长瘤兔生存时间的作用,同时未见明显肝功能损害。为临床应用 nHAP 治疗肝癌提供了基础研究的资料。

参考文献:

- [1] Feng LY, Li SP, Yan YH, et al. Inhibition of HAP Nanoparticle on W-256 Sarcoma of Rats in Vivo[J]. J Chin Biomed Engin, 2001,10(suppl):302-304.
- [2] Liu ZS, Tang SL, Ai ZL. Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Proliferation and Apoptosis of Human Hepatoma BEL-7402 Cells[J]. World J Gastroenterol, 2003,9(9):1968-1971.
- [3] 曹献英,李世普,任卫,等. 纳米羟基磷灰石的表征及其对肝癌抑制作用的研究[J]. 硅酸盐通报, 2003,24(4):21-24.
- [4] 齐志涛,曹献英,李世普,等. 纳米磷灰石对肝癌细胞端粒酶基因表达的影响[J]. 武汉理工大学学报, 2004,26(7):48-50.
- [5] Lin WY, Chen J, Lin Y, et al. Implantation of VX2 Carcinoma into the Liver of Rabbits: a Comparison of Three Direct-injection Methods[J]. J Vet Med Sci, 2002,64(7):649-652.
- [6] 关键,胡道予,孙振纲,等. 兔 VX2 肝癌 TAE 实验方法改良及影像学评价[J]. 临床放射学杂志, 2006,25(3):277-280.
- [7] Itokazu M, Sugiyama T, Ohno T, et al. Development of Porous Apatite Ceramic for Local Delivery of Chemotherapeutic Agents[J]. J Biomed Mater Res, 1998,39(4):536-538.
- [8] Benghuzzi H. Long-term Sustained Delivery of 3'-Azido-2', 3'-Dideoxythymidine in Vivo by Means of HAP and TCP Delivery Devices[J]. J Biomed Sci Instrum, 2000,36(2):343-348.
- [9] Hideki Aoki. Effects of HAP-sol on Cell Growth[J]. Report of the Institute for Medical and Dental Engineering, 1992,26(1):15-21.
- [10] Chamberlain M, Gray B, Hegg J. Hepatic Metastases: a Physiological Approach to Treatment[J]. Br J Surg, 1983,70(10): 596-599.
- [11] 刘丽萍,肖雁冰,肖子文,等. 家兔静脉注射羟基磷灰石纳米粒子的反应研究[J]. 卫生研究, 2005,34(4):474-476.

(收稿日期:2007-01-15 修回日期:2007-03-21)