

HepaSphere 微球联合 Avasting 栓塞治疗 VX2 兔肝癌的实验研究

杜玉清, 张 磊, 孙学栋, 顾文权, 王 彬

(上海市浦东新区浦南医院肿瘤介入科, 上海 200125)

【摘要】 目的 探讨 HepaSphere 微球联合 Avasting 肝动脉栓塞治疗兔移植性肝癌的疗效。方法 建立 40 只兔 VX2 肝癌模型, 随机分为四组, 每组 10 只, A 组: 肝动脉灌注生理盐水; B 组: 肝动脉灌注 Avasting; C 组: 肝动脉 HepaSphere 栓塞; D 组: 肝动脉 HepaSphere+Avasting 栓塞。两周后复查 CT 确定种植成功并计算瘤体大小, 免疫组化方法检测肝肿瘤血管内皮生长因子(VEGF)的表达和肿瘤微血管密度(MVD)。所得数据使用 SPSS12.0 统计软件进行处理, 各组间比较采用 t 检验、 χ^2 检验。结果 肿瘤生长抑制 D 组明显优于其他组($P<0.05$); VEGF 的表达及 MVD 计数 D 组显著低于其他组($P<0.05$)。结论 HepaSphere 微球联合 Avasting 行兔肝动脉栓塞能抑制移植型肝癌的生长及肝内转移, 并对肿瘤组织的微血管和 VEGF 的表达具有显著的抑制作用。

【关键词】 微球; Avasting; 栓塞治疗**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2014)04-0469-03

Effect of transarterial embolization with Avasting combined with HepaSphere in the treatment of rabbit with VX2 hepatic carcinoma. DU Yu-qing, ZHANG Lei, SUN Xue-dong, GU Wen-quan, WANG Bin. Department of Interventional Oncology, Shanghai Punan Gynecology Hospital, Shanghai 200125, CHINA

【Abstract】 Objective To study the therapeutic effect of transarterial embolization with Avasting and hepaSphere for rabbits with VX2 liver carcinoma. **Methods** Forty rabbits implanted with liver VX2 tumors were randomly divided into four groups, with 10 rabbits in each group. All rabbits were demonstrated with liver neoplasmas by MSCT and treated with transhepatic arterial embolization under the open laparotomy. Group A was given 3 ml saline; Group B was infused with 5 mg Avasting injection; Group C was embolized with hepaSphere; Group D was administered with 5 mg Avasting and hepaSphere. Mutislice spiral CT scan was performed to measure tumor volume and the expression of MVD and VEGF were determined with immunohistochemistry on the 14th day after treatment. All parameter thus gained were compared among the four groups. **Results** Group D showed the growth of tumor significantly better other three groups ($P<0.05$). The expression of MVD and VEGF in group D was significantly lower than that in other groups ($P<0.05$). **Conclusion** Transarterial embolization with Avasting combined hepaSphere can effectively inhibit the growth of hepatic tumor and reduce the expression level of VEGF and the formation of the tumor vessels.

【Key words】 Microspheres; Avasting; Transarterial embolization

经导管肝动脉化疗栓塞术(Transcatheter arterial chemoembolization, TACE)目前已成为公认的治疗不可切除性中晚期肝癌的首选疗法, 针对肝癌的富血管性及主要通过肝动脉获取血供的特点, 采用药物与碘油乳化制成栓塞剂, 阻塞肿瘤血供从而诱导肿瘤死亡, 取得了明显的治疗效果, 但其远期疗效仍不能令人满意, 肝癌 TACE 术后复发和转移是疗效欠佳的主要原因。肝癌 TACE 术后复发转移的原因之一是栓塞剂不理想, 不能达到真正的末梢及相对永久的栓塞; 肿瘤血管形成为另一个主要原因^[1-2]。如何做到肿瘤血管完全栓塞及抑制肿瘤新生血管是肿瘤研究的重点和发展方向^[3]。本研究采用 Avasting 联合 HepaSphere 微球行兔移植性肝癌肝动脉栓塞治疗, 探讨 HepaSphere 微球的栓塞疗效及局部药物抑制肿瘤血管再生的作用, 为进一步临床应用研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选用新西兰大白兔 40 只, 雌雄不限, 兔龄约 3 个月, 体重 2 kg, 由复旦大学动物实验室提供。VX2 肿瘤瘤株: 由普陀区中心人民医院惠赠。HepaSphere 微球: 丙烯酸钠与乙烯醇的共聚物, 由日本大阪 KGT 专科医院 Hori 教授惠赠。检查设备: GE 平板 DSA (Innova3100), 东芝 Aquilion one 320 排螺旋 CT 扫描机、Philip Brilliance 16 排螺旋 CT 扫描机。

1.2 VX2 肝癌模型制作和实验方法

1.2.1 VX2 肝癌模型的建立 兔术前禁食水 12 h, 以速眠新 II (0.2 ml/kg) 肌注麻醉, 完整取出荷瘤种兔腿外侧瘤块, 泡于盛有生理盐水的玻璃皿中, 用眼科剪剪成约 1 mm³ 瘤块备用; 将健康实验兔麻醉后, 仰卧固定, 兔腹脱毛消毒。选取肝左叶实质较厚处为接种部位, CT 导向下将 18 G 血管穿刺针刺入兔肝内, 调整针尖部位, 用 13 G 骨穿针之平头探子将穿

刺针内容物推送入肝,反复推送 2~3 次。推送完毕退出穿刺针及平头探子,局部压迫 1~2 min。

1.2.2 TAE 治疗 VX2 肝癌模型制作术后第 14 天,CT 检查确定瘤株种植成功后将实验兔随机分成四组(A、B、C、D 组),每组 10 只。实验兔麻醉固定后,腹股沟区备皮、消毒、铺巾,靠近腹股沟区沿股动脉纵行切开皮肤,暴露股动脉鞘,小心剪开股动脉鞘,分离出 1~2 cm 长的股动脉,近远端分别用 4# 丝线穿过备用。提起近端丝线,保持适当张力以暂时阻断血流,用眼科剪在股动脉前壁剪一小“V”形口,将短导丝插入,成功后将自制导管鞘顺导丝插入股动脉并向近端送入约 4 cm,结扎近端备用丝线以固定导管鞘。经鞘管引入 3F 微导管,寻找到腹腔动脉后行造影,确认肝固有动脉,超选择性插管至肝左或肝右动脉进行造影,证实肿瘤染色后按照分组要求注入药物。A 组:生理盐水;B 组:5 mg Avasting;C 组:HepaSphere 微球;D 组:HepaSphere 微球+5 mg Avasting。术毕将导管撤至腹主动脉时推注青霉素 80 万 U,拔除导管及鞘管,并同时结扎股动脉近远端,逐层缝合切口。

1.2.3 影像学评价 CT 平扫+增强扫描:VX2 肝癌模型制作术后 14 d、TACE 术后 14 d 分别行 CT 平扫加增强,参数设置:100 kV、120 mAs、层厚 5 mm、间距 5 mm、对比剂总量 4~5 ml、流速为 1 ml/s。确定肝内肿瘤生长,测量肿瘤体积变化 $[V=ab^2/2]$ (a 为肿瘤最大径,b 为肿瘤最小径),观察肿瘤数量及肿瘤坏死情况。肿瘤坏死程度,按以下标准分为 3 度:肿瘤坏死<50%为轻度坏死,坏死 50%~90%为中度坏死,坏死>90%为重度坏死。

1.2.4 病理及免疫组化检查 各组于治疗后 14 d CT 扫描后处死所有 VX2 肝癌兔;摘取肝脏,先进行大体观察,然后切取癌灶及其周围肝组织,用 4% 甲醛将解剖标本浸泡、固定,常规石蜡包埋。尽量取与灌注扫描层面相同的切面切片,然后由病理科专业技术人员作 HE 染色及 MVD、VEGF 免疫组化染色。由专职从事免疫组化检查的病理学专家观察 MVD 及 VEGF 表达情况,免疫组化检查试剂由武汉博士德生物工程有限公司提供。MVD 及 VEGF 表达测定在 400 倍光学显微镜下取 3 个“感兴趣区”(阳性细胞分布最密集的区域),取其平均数为该病例的 VEGF 阳性染色细胞数。MVD 记数参照 Weidert 的评判标准,选择 3 个高倍视野血管密度“感兴趣区”区域,任何黄染的细胞或细胞簇即使未显示管状结构,只要和邻近的微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织分开均计为 1 个血管,计算 3 个“感兴趣区”计数均值。

1.3 统计学方法 所有计量数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS12.0 软件进行统计学处理。

组间比较采用 q 检验,术前及术后比较采用 χ^2 检验,VEGF 的表达比较采用非参数检验,肝肿瘤 MVD 计数的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TAE 治疗 8 只实验兔因 TACE 或肝动脉造影后 7 d 之内死亡而被剔除,其中 A 组 1 只,B 组 2 只,C 组 3 只,D 组 2 只。死亡可能与手术创伤和异位栓塞有关。各组完成所有指标观察的实验兔只数:A=9,B=8,C=7,D=8。TAE 术后 14 d 复查造影:A 组和 B 组治疗前后肿瘤供血无明显变化;C、D 组原栓塞的肿瘤供血动脉未见再通,C 组肿瘤边缘见明显肿瘤新生血管,D 组肿瘤边缘未见或少见肿瘤新生血管。

2.2 肿瘤体积改变 D 组治疗后肿瘤体积增大明显小于 A、B、C 组,肿瘤体积变化差异有统计学意义(A、D 组: $q=62.24, P<0.01$;B、D 组: $q=57.79, P<0.01$;C、D 组: $q=28.38, P<0.01$),见表 1。

表 1 治疗前后肿瘤体积变化($\bar{x}\pm s$)

组别	组数(只)	治疗 14 d 肿瘤体积增大变化(cm^3)
A 组	9	3.19±0.2
B 组	8	3.05±0.18
C 组	7	0.57±0.02
D 组	8	0.04±0.01

2.3 治疗前后肿瘤 CT 强化特点 各组均可见肿瘤中心区低密度无强化坏死区,C、D 组坏死程度差异无统计学意义($\chi^2=3.348 2, P=0.067$);D 组坏死程度重于 A、B 组($\chi^2=4.287 5, P=0.038 4$; $\chi^2=12.444, P=0.000 4$);肿瘤及边缘强化:A、B 组肿瘤边缘以中度强化为主,C 组肿瘤边缘轻度强化,D 组轻度或未见强化,D 组肿瘤强化弱于 A、B、C 组(A、D 组: $\chi^2=17.000, P=0.000$;B、D 组: $\chi^2=16.000, P=0.000 1$;C、D 组: $\chi^2=4.285 7, P=0.038 4$),见表 2。

表 2 治疗前后肿瘤坏死及 CT 强化程度(只)

组别	坏死程度			强化程度		
	轻	中	重	弱	中	强
A 组	8	1	0	0	8	1
B 组	6	2	0	0	8	0
C 组	0	4	3	4	3	0
D 组	0	1	7	8	0	0

2.4 组织学与免疫组化

2.4.1 组织学检查 VX2 肿瘤细胞形态不规则,呈巢状分布,多为圆形、梭形,胞质较少,核大而深染,间质较少,瘤细胞异型明显,病理性核分裂象多见;治疗后 D 组观察肿瘤组织内为结构混乱的异型细胞团,巢状分布的瘤细胞团内可见大片状或多个小片状坏死区,大部分瘤细胞核固缩及核碎裂;C 组可见坏死灶周围有较多炎症细胞浸润,间质内有充血、扩张的毛细血管。

2.4.2 免疫组化检查 D组中肿瘤微血管稀少, VEGF 阳性细胞散在或未见分布; C组肿瘤组织及邻近间质内微血管多而密集, VEGF 阳性细胞弥漫分布于癌巢中; B组与A组肿瘤微血管密度及 VEGF 阳性细胞数居中; D组 VEGF 表达均较其他组明显减低(A、D组: $H=12.2106, P<0.05$; B、D组: $H=12.5646, P<0.05$; C、D组: $H=13.0056, P<0.05$); MVD 计数各组之间差异有统计学意义($P<0.05$), 见表3。

表3 各组兔肝肿瘤组织中 VEGF 表达和 MVD 计数情况(只)

组别	实验兔	VEGF 的表达				MVD 计数 ($\bar{x}\pm s$)
		-	+	++	+++	
A	9	0	3	5	1	86.59±4.17
B	8	1	2	4	1	60.21±5.01
C	7	0	1	3	3	50.24±8.27
D	8	7	1	0	0	21.43±3.12

注: VEGF 表达经秩和检验分析, D组表达低于其他组(A、D组: $H=12.2106, P<0.05$; B、D组: $H=12.5646, P<0.05$; C、D组: $H=13.0056, P<0.05$), MVD 计数经方差分析, $F=215.94, P=0.0000$, 各组之间差异有统计学意义。

3 讨论

3.1 本研究所使用栓塞剂的特点 HepaSphere 微球是一种高吸水性聚合物-丙烯酸钠与乙稀醇的共聚物(Acrylic acid sodium salt-polyvinyl alcohol copolymer), 呈完全性球体形状、无色透明硬质颗粒, 具有几个特点: ①在血管内膨胀; ②颗粒呈球体; ③富有显影性, 可作为永久性栓塞材料^[4-5]。HepaSphere 微球能吸收造影剂并随造影剂在动脉内流动, 栓塞过程中可监视栓塞材料的流动状态而防止其返流。HepaSphere 微球吸收离子性造影剂后颗粒直径由2倍增至2.5倍。把这些颗粒再移入血清1 min后增大至3.5倍。吸收了离子性造影剂的颗粒则变得柔软而富有变形性, 平均直径在0.7 mm的颗粒能畅通无阻地通过内径0.53 mm的微导管^[6]。

3.2 HepaSphere 微球行肝动脉栓塞治疗兔移植性肝癌的疗效观察 本研究中C与D组均使用HepaSphere 微球, 不同点为D组吸附 Avasting。DSA 透视下可见该栓塞剂注入肝动脉后顺血流快速到肿瘤达末梢小动脉内, 微球吸收血清后, 进一步增大, 不留缝隙地充填血管内腔, 完全使末梢小动脉及其分支完全性闭塞, 栓塞剂在瘤内沉积。复查造影见肿瘤血管及分支完全性闭塞, 肿瘤染色消失。栓塞后2周复查DSA: 两组均未见栓塞后肿瘤血管再通, 但C组见再肿瘤周围有细小肿瘤新生血管。CT及病理显示: D组肿瘤增长最慢, 瘤内坏死最明显; C组肿瘤生长略快于D组, 坏死范围稍小, 但两组比较差异无统计学意义; A组肿瘤生长最快, 肿瘤中心坏死最少, B组肿

瘤生长速度与肿瘤坏死与A组相似。但A、B组与D组比较无论肿瘤生长还是肿瘤坏死率差异均有统计学意义。因此我们认为HepaSphere 微球能选择性到达肿瘤供血动脉并将在肿瘤供血细小动脉及分支内快速增大, 达到彻底肿瘤阻断肿瘤供血的作用, 具有明显的抑制肿瘤生长的作用, 其疗效较为可靠。

3.3 抗肿瘤新生血管作用 HepaSphere 微球吸附药物可作为一种药物载体, 在局部充分发挥药物疗效。Avastin 是一种重组人源化抗 VEGF 的单克隆抗体, 通过与循环中 VEGF 的竞争性结合, 阻止 VEGF 与相应受体结合, 进而阻止肿瘤新生血管的发生, 且 Avasting 可使肿瘤及其周围组织的血管分布正常化, 因此可通过降低肿瘤组织间质压而有利于化疗药物的传递。Avasting 单药治疗晚期肝细胞癌的疗效已初获证实, 目前应用于临床抗肿瘤治疗, 其抗肿瘤新生血管作用具有浓度与时间依赖性特征^[7], 因此临床上主要采用持续静脉滴注配合全身静脉化疗, 也有与碘油混合行肝动脉化疗栓塞治疗肝癌的报道^[8]。

本研究结果显示, HepaSphere 微球联合 Avasting 栓塞治疗 VX2 肝癌, 有明显移植肿瘤新生血管的作用。在治疗2周后复查 DSA、CT 及组织病理, D组无论是影像学表现还是 VEGF 表达水平和 MVD 值均低于 A、B、C 组($P<0.05$)。

参考文献

- [1] Brown DB, Canlella JF, Sacks D, et al. Quality improvement guidelines for transhepatic arterial chemoembolization, embolization, and chemotherapeutic infusion for hepatic malignancy [J]. J Vasc Interv Radiol, 2006, 17: 225-232.
- [2] Wang JH. Interventional therapy for hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Interventional Radiology, 2005, 13(10): 721-723.
- [3] 王滨, 徐辉, 曹贵文, 等. 肝动脉化疗栓塞对肝癌肿瘤新生血管生成及血管内皮细胞生长因子表达的影响[J]. 中华放射学杂志, 2005, 39(2): 204-206.
- [4] Osuga K, Khankan AA, Hori S, et al. Transarterial embolization for large hepatocellular carcinoma with use of superabsorbent polymer microspheres: initial experience [J]. J Vasc Interv Radiol, 2002, 13: 929-934.
- [5] Hori S, Hiraishi K, Sugiura T, et al. Hepatocellular carcinoma treated by superabsorbent polymer microspheres(HepaSphere) bland embolization. 2007, CIRSE, Annual Meeting and Postgraduate Course: 305.
- [6] 杜玉清, 堀信一, 周为中, 等. HepaSphere 微球栓塞治疗高流量动静脉畸形[J]. 中华整形外科杂志, 2009, 25(3): 193-196.
- [7] Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptotic and anti-angiogenic strategies in liver and gastrointestinal malignancies [J]. Journal of surgical oncology, 2005, 90: 249-259.
- [8] Shiva SY, Jing M, Bryan MC. Hepatic tumor growth: target for angiogenesis inhibition? [J]. World J Surg, 2005, 29: 287-292.

(收稿日期: 2013-11-23)