

• 基础与实验研究 •

Injection of doxorubicin-carrying liquid-solid phase variant in situ gel for the treatment of rabbit residual VX2 liver cancer after HIFU irradiation

YAO Jin-peng¹, DAI Li-li^{1*}, LI Juan¹, ZHENG Yuan-yi², JIANG Ling²,
LU Guang-ming³, FENG Xiao-xia¹, WANG Zhi-gang²

(1. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 3. Department of Radiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective** To assess the curative effect of injection of doxorubicin-carrying liquid-solid phase variant in situ gel for residual rabbit VX2 liver cancer after high intensity focused ultrasound (HIFU) irradiation. **Methods** VX2 liver tumor models were set up in 24 rabbits, and non-complete HIFU ablation was performed. The rabbits were randomly divided into 2 groups (each $n=12$), i. e. HIFU+DOX-ISFI group (injecting doxorubicin-carrying liquid-solid phase variant in situ gel after HIFU irradiation) and HIFU+N-ISFI group (injecting drug-free liquid-solid phase variant in situ gel after HIFU irradiation). Tumor growth rate and PCNA expression were compared between the two groups. The distribution of drug in cancer was observed with a fluorescent imager of frozen tissue samples. **Results** Tumor growth rate of HIFU+DOX-ISFI group was obviously lower than that of HIFU+N-ISFI group ($P<0.05$). Proliferating index of HIFU+DOX-ISFI group was dramatically lower than that of HIFU+N-ISFI group ($P<0.05$). Fluorescence imaging showed the drug distributed from the injection center to the surrounding area, like a ladder shape. **Conclusion** Injection of doxorubicin-carrying liquid-solid phase variant in-situ gel can effectively treat the residual rabbit VX2 liver cancer after HIFU treatment.

[Key words] High-intensity focused ultrasound ablation; In-situ forming gel implant; Rabbits; Liver neoplasms

载阿霉素的液-固相变型原位凝胶注射 治疗兔 VX2 肝癌 HIFU 消融后残癌

药晋鹏¹, 戴立里^{1*}, 李娟¹, 郑元义², 蒋玲², 卢光明³, 冯晓霞¹, 王志刚²

(1. 重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学超声影像研究所, 重庆 400010;
3. 南京军区南京总医院放射科, 江苏 南京 210002)

[摘要] **目的** 观察载阿霉素液-固相变型原位注射凝胶(DOX-ISFI)治疗高强度聚焦超声(HIFU)消融兔 VX2 肝癌后残癌的疗效。**方法** 以 24 只兔建立 VX2 肝癌模型, 对肿瘤行 HIFU 不全消融, 随机分为 HIFU 消融与 DOX-ISFI 联合治疗组(HIFU+DOX-ISFI 组)、HIFU 消融与空白液-固相变型原位注射凝胶联合治疗组(HIFU+N-ISFI 组), 每组 12 只, 比较两组肿瘤生长率、PCNA 表达情况, 并以冰冻切片荧光显像观测药物瘤内分布。**结果** 处理后 HIFU+DOX-ISFI 组肿瘤生长明显减慢, 其生长率明显低于 HIFU+N-ISFI 组($P<0.05$); HIFU+DOX-ISFI 组肿瘤增殖指数明显低于 HIFU+

[基金项目] 重庆市科技攻关重大项目(2010AB50952)、重庆市卫生局课题(2010-2-159)。

[作者简介] 药晋鹏(1986—), 男, 山西沁原人, 在读硕士。研究方向: 肝癌的治疗。E-mail: 464441923@qq.com

[通讯作者] 戴立里, 重庆医科大学附属第二医院消化内科, 400010。E-mail: dli@cqums.edu.cn

[收稿日期] 2012-08-30 **[修回日期]** 2012-09-23

N-ISFI 组 ($P < 0.05$); 荧光显像显示药物从注射中心向周围呈阶梯状分布。结论 DOX-ISFI 能有效治疗 HIFU 消融兔 VX2 肝癌后的残癌。

[关键词] 高强度聚焦超声消融术; 原位凝胶植入剂; 兔; 肝肿瘤

[中图分类号] R445.1; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-8475(2012)11-0814-05

原发性肝癌是常见恶性肿瘤^[1]。临床常用局部经皮治疗方法中包括各种消融手段,如注射乙醇或醋酸,射频、激光或微波加热消融以及冷冻消融等^[2-3]。单独采用消融手段治疗肿瘤常因消融不全而导致肿瘤残留^[4]。众多研究^[5-8]表明,消融后给予全身或局部药物治疗能提高治疗效果。高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)是目前快速发展的非侵入性局部消融技术;生物可降解注射型原位凝胶植入剂(injectable biodegradable in-situ forming gel implant)是近年来缓控释注射剂领域的研究热点。本实验制备载阿霉素液-固相变型原位注射凝胶(DOX-ISFI),对 HIFU 消融兔 VX2 肝癌后残癌行注射治疗,以期治疗残癌提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA, 50 : 50, 分子量 20000 Da, 济南岱罡生物工程有限公司), N-甲基吡咯烷酮(NMP, Sigma); 阿霉素原料药(DOX, 北京索莱宝科技有限公司); 增殖细胞核抗原(PCNA, 武汉博士德生物工程有限公司); 新西兰大

白兔(重庆医科大学实验动物中心), 雌雄不限, 体质量 2.0~2.5 kg; Philips iU22 彩超仪; Olympus CKX41 倒置荧光显微镜等。

1.2 液-固相变型原位注射凝胶的制备^[9] 将 PLGA 与 DOX 溶于装有 NMP 的 5 ml 注射器中, 注射器接三通管, 三通管另一端接另一 5 ml 注射器, 来回推注混匀; 将获得的溶液加入锡箔纸包裹的离心管, 回转式振荡恒温培养箱 80 转/分, 37℃ 过夜, 4℃ 条件贮存。加入的 3 种成分的质量比为 PLGA : NMP : DOX = 55 : 40 : 5。

1.3 VX2 肝癌模型的建立 在无菌条件下于 VX2 肝癌种兔肝脏中取出肿瘤, 切成直径约 1 mm 的瘤块, 浸泡于生理盐水中备用。麻醉实验兔后常规备皮, 消毒, 在剑突下沿腹中线做长约 3 cm 的切口, 暴露肝左叶于腹外, 以眼科镊刺破, 形成一个深度约 5 mm 窦道, 取一备用瘤块埋置于窦道深处, 纱布压迫止血, 逐层缝合伤口。术后肌内注射青霉素 3 天, 每天 80 万 U。

1.4 实验分组及处理 参照文献^[3]方法对荷瘤兔的肿瘤行 HIFU 消融。将兔随机分为两组, 每组 12 只。

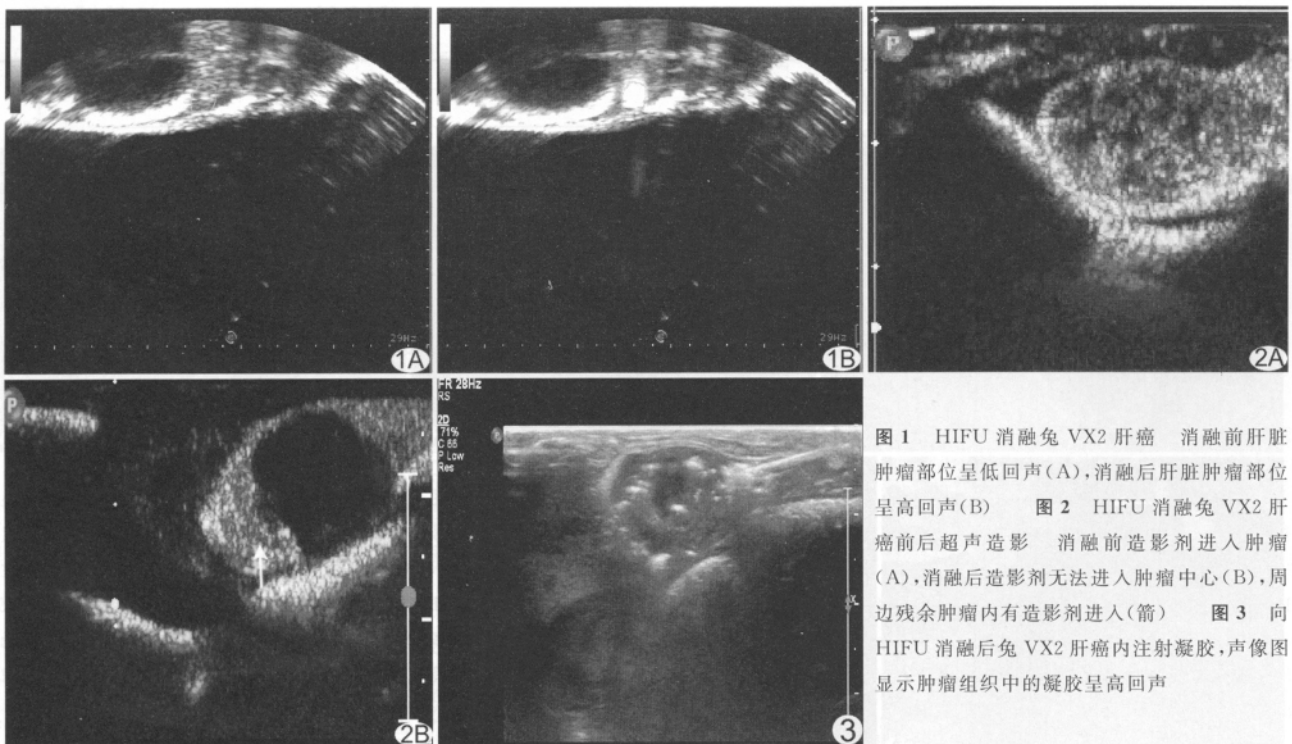


图 1 HIFU 消融兔 VX2 肝癌 消融前肝脏肿瘤部位呈低回声(A), 消融后肝脏肿瘤部位呈高回声(B) 图 2 HIFU 消融兔 VX2 肝癌前后超声造影 消融前造影剂进入肿瘤(A), 消融后造影剂无法进入肿瘤中心(B), 周边残余肿瘤内有造影剂进入(箭) 图 3 向 HIFU 消融后兔 VX2 肝癌内注射凝胶, 声像图显示肿瘤组织中的凝胶呈高回声

选用重庆医科大学海扶中心 JC200 型高强度聚焦超声治疗系统,功率 250W、单点辐照 3 s,重复数次,模拟消融不完全的情况,在肿瘤周边留下残癌(图 1)。对 HIFU 消融与空白液-固相变原位注射凝胶联合治疗组(HIFU+N-ISFI 组)行 CEUS,观察消融情况;再于超声引导下经皮穿刺肿瘤,注射不载 DOX 的空白凝胶 0.4 ml。对 HIFU+DOX-ISFI 组行 CEUS 观察消融情况(图 2),再于超声引导下经皮穿刺至肿瘤,注射载 DOX 凝胶 0.4 ml(图 3)。于治疗后第 4~8 天行超声检查,测量肿瘤大小;第 8 天对两组荷瘤兔实施安乐死,取出肿瘤标本,沿长径切为均等两份,一份以 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片行病理(图 4)、免疫组化检测,另一份做冰冻切片,于荧光显微镜下观察,之后分析药物分布。

1.5 观察指标

1.5.1 超声监测治疗前后肿瘤体积变化 超声测量肿瘤相互垂直的长(a)、宽(b)、厚(c)三个径线,每个径线各测 3 次,取平均值,按公式计算肿瘤体积(V): $V = \pi/6 \times a \times b \times c$,肿瘤生长率(GR): $GR = [(治疗\后\体积 - 治疗\前\体积) / 治疗\前\体积] \times 100\%$ 。

1.5.2 检测 PCNA 表达 石蜡切片,常规脱蜡至水

等;以 1% H₂O₂ 作用 20 min,消除内源性过氧化物酶活性;将切片置于 0.01 M pH 值为 6.0 的柠檬酸缓冲液中,微波 98℃、10 min 作用 2 次,自然冷却;以 5%~10%山羊血清(磷酸盐缓冲液稀释)于室温下湿盒封闭 20 min,倒去血清,不洗,擦干组织周围多余水分,加入 1:200 稀释的一抗 50 μl,4℃ 过夜;Envision 试剂 37℃ 作用 30 min;DAB+H₂O₂ 显色约 8 min,镜下控制显色程度,即时终止;复染苏木素衬染 30 s,盐酸乙醇蓝化 2 s,微波蓝化后,常规树脂封片。

结果判定:光镜下肿瘤细胞核内出现棕黄色或棕褐色颗粒、且着色强度高于背景非特异性染色者判定为阳性细胞。每张切片随机计数 5 个以上高倍视野(×400),不少于 1000 个肿瘤细胞,计算阳性细胞的百分比;增殖指数(proliferating index, PI): $PI = (PCNA\ 阳性\ 细胞\ 数 / 计数\ 肿瘤\ 细胞\ 总数) \times 100\%$ 。

1.5.3 利用阿霉素的自身荧光性分析治疗后 8 天药物在肿瘤中的分布 将冰冻切片置于 Olympus CKX41 型倒置荧光显微镜低倍镜下观察,选覆盖注射中心至肿瘤周边的视野,转为荧光镜观察后采图,以凝胶注射中心为原点,用 Getcolorpixels 软件测量随与原点距离而变化的图像荧光强度,于同一圆周上测量

表 1 两组肿瘤治疗前后体积变化及生长率($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前体积(cm ³)	治疗后 4 天体积(cm ³)	治疗后 8 天体积(cm ³)	治疗后 8 天生长率(%)
HIFU+DOX-ISFI 组	1.38±0.14*	1.59±0.14*	2.07±0.16*	49.86±7.95*
HIFU+N-ISFI 组	1.40±0.17	1.68±0.17	2.54±0.17	81.24±6.98

注:*,与 HIFU+N-ISFI 组比较,P<0.05

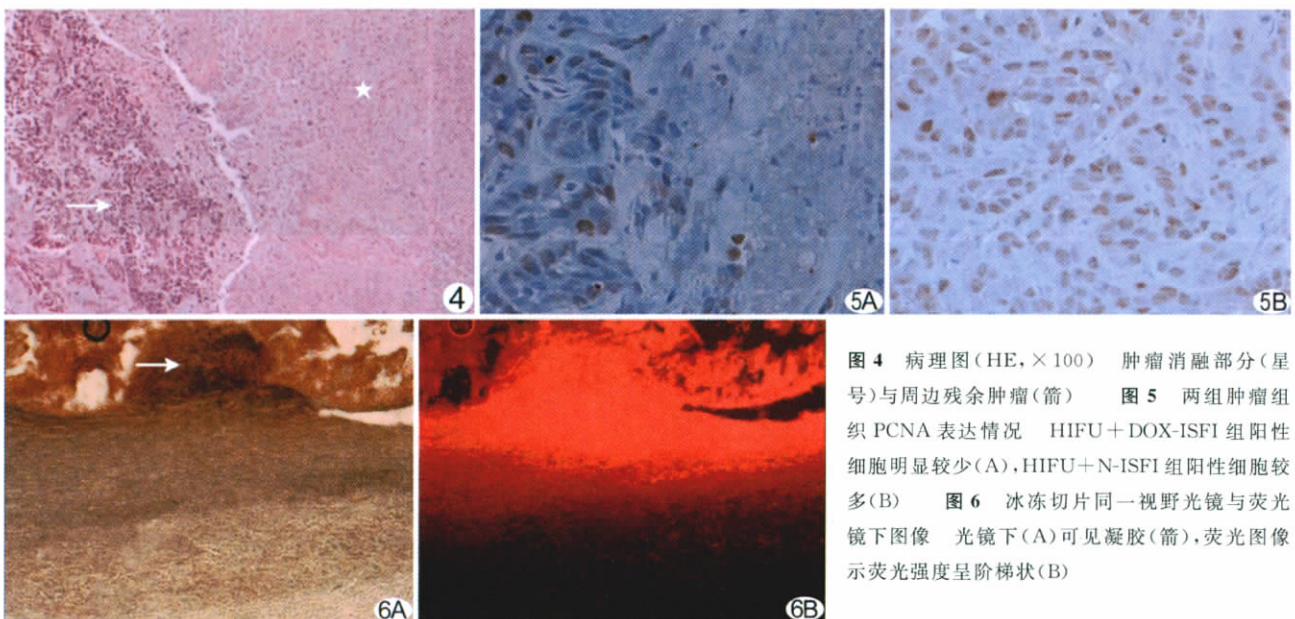


图 4 病理图(HE, ×100) 肿瘤消融部分(星号)与周边残余肿瘤(箭) 图 5 两组肿瘤组织 PCNA 表达情况 HIFU+DOX-ISFI 组阳性细胞明显较少(A),HIFU+N-ISFI 组阳性细胞较多(B) 图 6 冰冻切片同一视野光镜与荧光镜下图像 光镜下(A)可见凝胶(箭),荧光图像示荧光强度呈阶梯状(B)

5 点,取平均值,绘制曲线。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计学软件,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验比较两组参数, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组肿瘤体积变化及生长率 两组肿瘤体积均随时间延长而增大,治疗后 HIFU+DOX-ISFI 组肿瘤生长较 HIFU+N-ISFI 组明显减慢(表 1, $P < 0.05$)。

2.2 PCNA 表达 肝癌组织均见 PCNA 表达,棕黄色颗粒均位于胞核,两组肿瘤组织 PCNA 表达见图 5。HIFU+DOX-ISFI 组肝癌 PI 为 $(22.18 \pm 7.27)\%$,明显低于 HIFU+N-ISFI 组的 $(68.13 \pm 9.19)\%$ ($P < 0.05$)。

2.3 冰冻切片荧光显像分析治疗后 8 天药物在肿瘤中分布 冰冻切片光镜及荧光下显像直观显示,阿霉素自注射中心向周围肿瘤组织扩散达一定距离(图 6)。荧光强度随距离变化关系曲线图(图 7)显示,荧光强度在距原点 0.25 cm 范围内几乎无降低趋势,表明该范围阿霉素浓度较高;之后荧光强度随距离增加而逐渐减弱,在距离原点 0.55 cm 的范围外,荧光强度下降到原点荧光强度的约 20%。由此可以推测,第 8 天时肿瘤组织中注射原点 0.25 cm 范围内均有较高的阿霉素浓度。

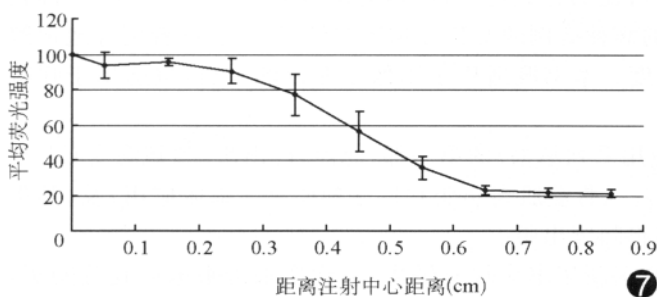


图 7 荧光强度随距离变化关系图

3 讨论

与其他消融技术相比,HIFU 有其独特优势^[10-12];但 HIFU 在治疗深部肿瘤、声通道上有肋骨阻挡的肿瘤以及血供丰富的肿瘤时效率降低,导致肿瘤消融不全,存在复发隐患^[13]。

如何降低 HIFU 消融后肿瘤复发率是 HIFU 治疗面临的问题之一。联合治疗一直被认为是提高消融疗效的理想途径。张国喜等^[14]报告了 HIFU 联合肝动脉化疗栓塞治疗中-晚期原发性肝癌的临床效果;张

喆^[15]报道了 HIFU 联合免疫调节剂乌体林斯治疗 48 例胰腺癌免疫功能的临床分析。现今化疗仍是治疗恶性肿瘤的主要手段之一,但传统化疗方法存在不良反应明显、难以长效维持治疗浓度等缺点,因此,联合治疗时应选择更有效的化疗方法。生物可降解注射型原位凝胶植入剂是近年来缓控释注射剂领域的研究热点。将包裹治疗药物的液态凝胶注射到给药部位,接触生理液体后,凝胶由液态转变为固态(液-固相变),随聚合物的降解、溶蚀而在给药部位缓慢释药。其优点为:①相对于传统给药方式如口服、微球注射和固体物植入,该方法既可避免单剂量给药需多次重复的不便,又可免去植入手术的痛苦;②能以液体状态自由加载各种性质和分子量的药物;③相对于标准的微球制备多步工艺,其制备更加简单方便,并可避免使用对人体不利的有机溶剂如二甲氧烷等;④与给药部位特别是黏膜组织亲和力强,药物滞留时间长,控释性能好,能达到延长释药周期、减少药物不良反应的目的。

本实验受设备条件所限,肿瘤消融后的残癌较大;而实验结果表明,采用自制 DOX-ISFI 对 HIFU 消融兔 VX2 肝癌后的残癌进行注射治疗,可明显抑制肿瘤生长,显著降低肿瘤增殖指标,表明该方案能切实提高 HIFU 消融对兔 VX2 肝癌的疗效;载阿霉素液-固相变原位注射凝胶注入肿瘤后 8 天,荧光图像提示肿瘤组织中有较高阿霉素浓度的范围分布于注射中心外 0.25 cm 的圆周内,表明载药凝胶在肿瘤中释药有较好的扩散与分布,不同于注射无水乙醇等一次性治疗,化疗药物能更持久广泛地分布于肿瘤组织,杀灭因消融不全而残留的癌细胞。

综上,本实验制备的 DOX-ISFI 能有效治疗 HIFU 消融兔 VX2 肝癌后的残癌,为治疗残癌提供了借鉴。

[参考文献]

- [1] 张勇,王志刚,康娟,等. 超声定位辐照载血卟啉微泡治疗兔肝 VX2 肿瘤的实验研究. 中国介入影像与治疗学,2012,9(10):757-761.
- [2] 朱梅,李佩惊,钟渝,等. 低能量脉冲式超声联合微泡对兔 VX2 肿瘤微循环的阻断作用. 中国医学影像技术,2012,28(4):621-625.
- [3] Weinberg BD, Blanco E, Lempka SF, et al. Combined radiofrequency ablation and doxorubicin-eluting polymer implants for liver cancer treatment. J Biomed Mater Res A, 2007,81(1):205-213.
- [4] 唐裕福,张怡冰,罗斌,等. 肿瘤残余在肝癌微波消融治疗后出现的原因及防治. 世界华人消化杂志,2011,19(10):1075-1080.
- [5] Ahmed M, Liu Z, Lukyanov AN, et al. Combination radiofre-

- quency ablation with intratumoral liposomal doxorubicin: Effect on drug accumulation and coagulation in multiple tissues and tumor types in animals. *Radiology*, 2005, 235(2):469-477.
- [6] Ahmed M, Monsky WE, Girnun G, et al. Radiofrequency thermal ablation sharply increases intratumoral liposomal doxorubicin accumulation and tumor coagulation. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6327-6333.
- [7] Goldberg SN, Saldinger PF, Gazelle GS, et al. Percutaneous tumor ablation: Increased necrosis with combined radio-frequency ablation and intratumoral doxorubicin injection in a rat breast tumor model. *Radiology*, 2001, 220(2):420-427.
- [8] Haaga JR, Exner AA, Wang Y, et al. Combined tumor therapy by using radiofrequency ablation and 5-FU-laden polymer implants: Evaluation in rats and rabbits. *Radiology*, 2005, 237(3): 911-918.
- [9] Patel RB, Solorio L, Wu H, et al. Effect of injection site on in situ implant formation and drug release in vivo. *J Control Release*, 2010, 147(3):350-358.
- [10] Li YY, Sha WH, Zhou YJ, et al. Short and long term efficacy of high intensity focused ultrasound therapy for advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(12): 2148-2154.
- [11] Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2005, 65(6):2457-2464.
- [12] 曹玮, 吴发伟, 刘毅勇, 等. 高强度聚焦超声对中晚期肝癌患者机体免疫细胞及其活性的影响. *介入放射学杂志*, 2009, 18(4):308-310.
- [13] 牛陵川, 邹文兵, 张炼, 等. 乳腺癌高强度聚焦超声消融后残留肿瘤增殖能力的变化. *上海交通大学学报: 医学版*, 2010, 30(2): 200-203, 207.
- [14] 张国喜, 熊六林, 姚松森, 等. 高强度聚焦超声联合肝动脉化疗栓塞治疗中晚期原发性肝癌 105 例分析. *中国超声医学杂志*, 2005, 21(1):71-73.
- [15] 张喆. 高强度聚焦超声联合免疫调节剂乌林斯治疗胰腺癌 48 例免疫功能临床分析. *检验医学与临床*, 2011, 8(15):1853-1854.

《胸部病变 CT 与 MR 对比临床应用》已出版

由南昌大学第一附属医院龚洪翰、张伟两位教授主编,人民卫生出版社出版的《胸部病变 CT 与 MR 对比临床应用》一书已出版,并在全国发行。本书采用 CT 与 MR 对比的方式进行撰写,对胸部同一疾病,在同一时间、同一层面进行扫描的 CT 与 MR 所见进行对比,通过大量的病种病例的 CT 与 MR 图像对比,让读者更好地理解 CT 与 MR 两种不同成像技术在胸部病变应用的优势与限度。本书既适用于影像专业诊断人员,也适用于呼吸内科、心胸外科专业人员。

本书是龚洪翰教授任总主编的《CT 与 MR 对比临床应用系列丛书》的第三部,此前,已出版《颅脑病变 CT 与 MR 对比临床应用》及《腹部病变 CT 与 MR 对比临床应用》。《骨骼肌肉病变 CT 与 MR 对比临床应用》及《耳鼻喉—头颈、眼、口腔病变 CT 与 MR 对比临床应用》,明年将陆续出版。

本书为 16 开精装本,全书约 120 万字。定价 115 元,全国新华书店均有销售,也欢迎来函来电向我院购买,免费邮寄。

联系人:王琳娜;地址:南昌市永外正街 17 号,南昌大学第一附属医院;邮编:330006;联系电话:0791-88693825 或 88692582,传真:0791-88623153。邮箱:7709318@qq.com。