

文章编号:1005-6947(2008)01-0013-03

· 肝肿瘤专题研究 ·

包载反义 MRP 重组腺病毒微球肝动脉注射 治疗肝癌的实验研究

王晓波¹, 余少鸿¹, 严律南², 陈永兵²

(1. 重庆市涪陵中心医院 肝胆外科, 重庆 涪陵 408000; 2. 四川大学华西医院 普通外科, 四川 成都 610041)

摘要:目的 探讨包载反义 MRP 重组腺病毒微球逆转肝癌的效果。方法 设无处理组、生理盐水组、空白微球组 as-MRP rAdV 组, 采用携带 as-MRP rAdV PELA 制备的微球经肝动脉注射组等 5 组, 观察其靶向性治疗效果。结果 rAdV 微球组肿瘤体积及生长率显著小于其他 4 组(均 $P < 0.05$), 平均生存时间显著延长(均 $P < 0.05$), 可见肝癌组织 rAdV 荧光强表达。结论 rAdV 微球可显著缩小肝脏肿瘤体积, 抑制肿瘤生长。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1):13-15]

关键词: 癌, 肝细胞/治疗; MRP, 反义; 腺病毒, 重组; 微球; 肝动脉注射

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

Hepatic arterial injection of recombinant adenovirus microspheres carrying antisense multidrug resistance-associated protein gene for hepatocellular cancer in rats

WANG Xiaobo¹, YU Shaohong¹, YAN Lunan², CHEN Yongbing²

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing Fuling Center Hospital, Fuling, chongqing 408000, China; 2. Department of General Surgery, Huaxi Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To evaluate recombinant adenovirus microspheres encapsulated with antisense MRP (as-mrp) on reversion of hepatocellular carcinoma. **Methods** The rats were divided randomly into 5 groups: control group; hepatic arterial injection of normal saline group, microspheres carrying no viruses group, rAdV carrying as-mrp group, and microspheres with encapsulation of as-mrp rAdV (MER) group. The therapeutic effect were observed. **Results** The tumor growth inhibition and the mean life time in MER group were superior to than of other 4 groups ($P < 0.05$). The tumor tissue were observed to have fluorescence intensity, but was negative in other tissues. **Conclusions** Recombinant adenovirus microspheres can effectively inhibit HCC.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1):13-15]

Key words: Carcinoma, Hepatocellular/ther; MRP, Antisense; Adenoviruses, Recombinant;

Microsphere; Hepatic Arterial Injection

CLC number: R 735.7

Document code: A

化疗在预防肝细胞癌 (hepatic cellular carcinoma, HCC) 术后复发和转移中有着重要的作用, 但多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 现象导致肝癌对化疗不敏感。笔者前期研究发现, 多药耐药相

关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) 基因或蛋白在肝癌等多种恶性肿瘤患者体内表达增高^[1]。携带反义 MRP 的 rAdV 及微球在体外培养的肝癌耐药细胞可部分逆转 MDR 现象^[2-3]。晚期肝癌细胞 95% 的血供来自肝动脉。利用这一特点, 本研究将携带反义 MRP 基因片断的重组腺病毒微球经肝动脉注射, 将封闭 MRP 的反义 rAdV 与微球控释给药系统相结合, 以期探讨对肝癌的生长与动物模型的生存期是否有影响。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170925)。

收稿日期: 2007-06-23; **修订日期:** 2007-12-10。

作者简介: 王晓波, 男, 重庆市涪陵中心医院主任医师, 主要从事肝胆疾病基础与临床方面的研究。

通讯作者: 严律南 E-mail: yalvnan688@126.com

1 材料与方 法

1.1 实验动物与材料

Wistar 雄性大鼠(250 ~ 300 g), 断乳 Wistar 大鼠(50 ~ 80 g) 由四川大学华西医学实验动物中心提供。Walker-256 细胞株由上海医学工业研究院细胞室提供。as-MRP rAdV 微球自行研制(另文发表), 直径约 1.765 μm , 包封率为 52.4%, 载病毒率为 5.5×10^8 efu/mg, 在 120 h 内释放病毒量接近 50%, 总的释放时间长于 240 h, 释放出的病毒保持活性。盐酸阿霉素购自意大利法玛西亚普强公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肝癌模型制作 将冻存的 Walker-256 细胞株复苏, CO₂ 培养箱内体外培养至细胞数 $(2 \sim 4) \times 10^6/\text{mL}$, 取 1 mL 注入断奶后体重约 80 g 的雌性大鼠腹腔内; 7 ~ 8 d 后抽取腹水, 于另 1 只雌性大鼠(断奶, 体重约 80 g) 前肢皮下注射 0.5 mL 腹水; 1 周后雄性大鼠肿瘤长成 1 cm³ 时, 麻醉后无菌下取出肿瘤, 取边缘瘤组织切成 1 mm³ 瘤块, 置 1640 培养液中备用。采用肝内隧道植入法, 取雄性大鼠 40 只, 麻醉后于上腹正中切口 1.5 cm 进腹, 将肝左叶挤出切口, 在膈面斜形打一深约 2 mm 的隧道, 将备好的瘤块植入; 明胶海绵压迫止血后复原肝脏, 缝合切口入笼饲养。

1.2.2 实验分组 模型制作后 1 周, 乙醚麻醉下取上腹正中切口 4 ~ 5 cm 进腹, 检查肿瘤生长情况。于肝门的右侧游离肝动脉, 远肝端结扎; 在手术放大镜下插入外径 0.5 mm, 内径 0.2 mm 导管, 妥善固定后接注射器注药。分别于造模后 7 d 再次剖腹, 暴露肝脏。按动物体重随机分为 5 组, 每组 8 只, 按实验要求予不同处理。对照组: 仅测肿瘤的最长径及最短径, 开腹与关腹时间与插管时间相当。生理盐水组: 肝动脉结扎并插管注入生理盐水 0.5 mL。空白微球组: 肝动脉结扎并插管注入含 1×10^9 efu/mL 重组腺病毒液。rAdV 组: 肝动脉结扎并插管注入空白微球, 量相当于 rAdV 微球组。rAdV 微球组(实验组): 肝动脉结扎并插管注入含 1×10^9 efu/mL rAdV 微球。手术后 48 h, 各组均接受阿霉素(2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 体重, 溶于 0.2 mL 生理盐水中) 腹腔注射, 每周 2 次, 连续 2 周。同时抽取静脉血检测肝功能。

1.2.3 疗效观测 阿霉素注射完后 24 h 各取 4 只动物处死, 完整切取瘤体, 用游标卡尺测定肿瘤最长径(a) 和最短径(b), 以公式 $V = ab^2/2$ 计

算肿瘤体积及肿瘤生长率及抑制率。肿瘤生长率 = 治疗前体积/治疗后体积。肿瘤抑制率 = (对照组肿瘤平均体积 - 治疗组肿瘤平均体积)/对照组肿瘤平均体积。完整切取肿瘤肝组织, 脾肾肺组织细胞, 观察荧光表达情况。在荧光显微镜下计数 4 只大鼠各种组织内 GFP 表达阳性的细胞, 计数该视野的全部细胞数, 计算平均转染率; 同时送病理检查。将每组剩余 4 只荷瘤大鼠在相同条件下饲养, 记录每只动物死亡时间。荷瘤自然生存时间 = 死亡时间 - 肿瘤植入时间。

1.3 统计学处理

组间比较用 *t* 检验, 用 SPSS10.0 软件进行分析。

2 结 果

2.1 肿瘤生长率和抑制率

治疗前各组之间肿瘤体积无明显差异 ($P > 0.05$)。治疗后对照组肿瘤明显增大, 生理盐水组和空白微球组肿瘤也不同程度地增大, 但显著小于对照组; 与治疗前比较, rAdV 微球组和 rAdV 组肿瘤的体积及生长率明显被抑制, rAdV 微球组尤其为显著(表 1)。

表 1 各组治疗前后肿瘤体积、肿瘤生长率、肿瘤抑制率($\bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤体积(cm ³)		肿瘤生长率(%)	肿瘤抑制率(%)
	治疗前	治疗后		
对照组	0.0330 \pm 0.026	0.2894 \pm 0.0269	8.79 \pm 0.34	0
生理盐水组	0.0354 \pm 0.018	0.1714 \pm 0.0158	4.82 \pm 0.30 ¹⁾	40.77
空白微球组	0.0339 \pm 0.018	0.1588 \pm 0.0159	4.67 \pm 0.67 ¹⁾	45.13
rAdV 组	0.0332 \pm 0.015	0.0988 \pm 0.055	2.97 \pm 0.29 ¹⁾	65.86
rAdV 微球组	0.0354 \pm 0.006	0.0340 \pm 0.004	0.96 \pm 0.25 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	88.25

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与生理盐水组比较, $P < 0.05$; 3) 与空白微球组比较, $P < 0.05$; 4) 与 rAdV 组比较, $P < 0.05$

2.2 生存时间

rAdV 微球组动物平均生存时间显著长于其他组(均 $P < 0.05$)(表 2)。

表 2 平均生存时间(d, $\bar{x} \pm s$)

组别	生存时间(d)
对照组	23.4 \pm 3.2 ¹⁾
生理盐水组	25.3 \pm 3.7 ¹⁾
空白微球组	26.5 \pm 4.1 ¹⁾
rAdV 组	33.7 \pm 2.9 ¹⁾
rAdV 微球组	43.6 \pm 7.4

注: 1) 与 rAdV 微球组比较, $P < 0.05$

2.3 组织细胞 rAdV 荧光表达

治疗前各组间无明显荧光表达。治疗后对照组、生理盐水组和空白微球组均无荧光表达。

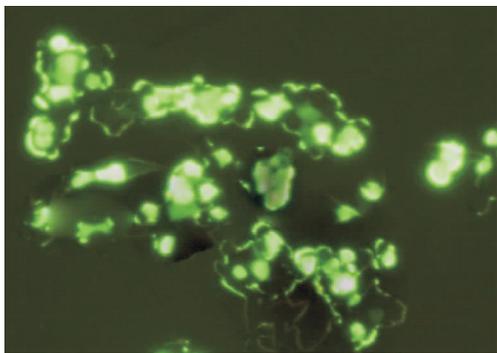


图1 rAdV 微球组肿瘤组织荧光照片(×100)

2.4 肝功能改变

各组术后 14d 均有血谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)轻度升高,总蛋白(TP)降低,血总胆红素(TBIL)轻度升高。rAdV 微球组与其它 4 组比较,无显著性差异。

2.5 病理改变

rAdV 微球组肿瘤组织细胞变性坏死严重,汇管区浸润淋巴细胞多,部分胆管壁破坏。rAdV 组肿瘤组织细胞变性坏死虽较严重,汇管区淋巴细胞浸润,但较 rAdV 组为轻;对照组相对最轻,仅有少量变性,点状坏死。rAdV 微球组动物肝血窦内有微球存在,其余脏器未见异常。

3 讨论

Walker-256 为大鼠自发的乳腺癌细胞系,将其移植肝脏后,瘤体生长至直径 > 3 mm 时,主要由肝动脉供血,生长特性为膨胀性和浸润性,对化疗药物不敏感,与人类肝癌相似。近年来该模型被广泛应用于肝癌化疗的实验研究。晚期肝癌细胞 95% 的血供来自肝动脉。影响化疗药进入肿瘤的关键因素是血-肿瘤屏障^[4],因此,选用药物经肝动脉注射比门静脉更有效,可减少肿瘤血供而发挥杀灭肿瘤的作用。国内外研究证实此观点^[5]。

肝动脉结扎不能完全阻断肝脏恶性肿瘤的微循环关系,肝内外侧支循环很快建立,栓塞后肝动脉血流很快恢复。同时,肿瘤内动脉与门静脉交通支十分常见^[6],门静脉血流通过门静脉进入肿瘤,一旦肝动脉阻断,门静脉进入肿瘤的血流增加,维持肿瘤生长,不能导致肿瘤的完全坏死。肝固有动脉结扎对肿瘤的抑制和生存期的延长是有限的,本实验肝动脉结扎+生理盐水组肿瘤生长率仅降低 50%,肿瘤抑制率仅为 40%,平均生存时间仅延长 3 d,证实了肝固有动脉结扎对肿

rAdV 微球组和 rAdV 组瘤组织有荧光表达,rAdV 微球组有荧光表达明显增强(图 1-2)。

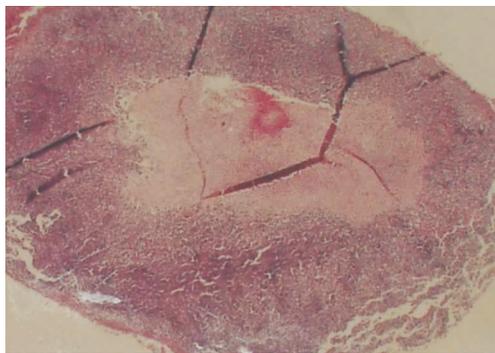


图2 rAdV 微球组肿瘤组织病理切片(HE 染色×200)

瘤的抑制作用有限,此结果与临床观察一致。

本实验中所用 PELA 微球为生物降解性载体,直径小,亲水、无毒、无免疫原性、高包封率、大小可调节性等优点;降解时间较长,主要停留在肝血窦,释放反义 MRP 基因病毒,可有效缩小肿瘤体积,延长基因作用时间,获得基因治疗的效果;又可使治疗基因靶向性到达肿瘤组织。本实验 rAdV 微球组能够获得基因治疗和靶向治疗共同作用,杀死肿瘤组织,延长动物的生存期。

包载反义 MRP rAdV 微球经肝动脉注射,肝肿瘤组织 rAdV 荧光表达强,肾组织荧光表达弱,脾肺组织无荧光表达,反映肿瘤组织表达特异性强。提示靶向微球与病毒型载体结合使用是可行的,也是基因治疗研究的一个发展方向。

参考文献:

- [1] Roelofsen H, Vos TA, Schippers IJ, *et al.* Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte derived cells [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(2):511-521.
- [2] 余少鸿,严律南,张燕,等.包载反义 RNA 重组腺病毒微球体外逆转肝细胞癌 MRP 的表达[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2005, 36(4):471-474.
- [3] 陈琳,苟兴华,严律南,等.携带反义多药耐药相关蛋白的重组腺病毒载体的构建[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2003, 4(1):131-134.
- [4] Bilbao R, Bustos M, Alzuguren P, *et al.* A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(21):1824-1832.
- [5] Gerolami R, Cardoso J, Bralet T, *et al.* Enhanced in vivo adenovirus-mediated gene transfer to rat hepatocarcinomas by selective administration into the hepatic artery [J]. *Gene Ther*, 1998, 5(7):896-904.
- [6] Elshami AA, Kucharczuk JC, Stenxm DH, *et al.* The role of immunosuppression in the efficacy of cancer gene therapy using adenovirus transfer of the herpes simplex thymidine kinase gene [J]. *Ann Surg*, 1995, 222(3):298-307; 307-310.