

· 基础研究 ·

丝裂霉素纤维蛋白胶凝胶瘤内注射治疗裸鼠肝癌*

殷香保, 邬林泉, 傅华群, 罗志强, 方路, 章永恩

(南昌大学第二附属医院肝胆外科, 南昌 330006)

摘要:目的 探讨丝裂霉素纤维蛋白胶凝胶(MMC-FG)瘤内注射对裸鼠肝癌的治疗效果,为其临床应用提供实验依据。
方法 30只成功建模的皮下荷肝癌裸鼠随机分成5组,分别是瘤内注射MMC-FG组(A组)、腹腔内注射MMC-FG组(B组)、瘤内注射丝裂霉素MMC组(C组)、瘤内注射FG组(D组)、瘤内注射生理盐水组(E组)。给药后观察裸鼠肿瘤生长情况,称取肿瘤重量并计算瘤重抑制率,检测裸鼠外周血液白细胞(WBC)及血小板(PLT)。另50只荷肝癌裸鼠随机分成上述5组,同法给药后观察各组裸鼠的生存时间。**结果** A组裸鼠肿瘤体积增长最缓慢,瘤重抑制率为53.40%,肿瘤重量明显低于其他组($P < 0.05$)。C组裸鼠外周血液WBC及PLT检测低于A组($P < 0.05$),与B、D组及E组均无明显差异($P > 0.05$)。A组裸鼠的生存时间长于其他组($P < 0.05$)。**结论** 瘤内注射MMC-FG可有效抑制肿瘤生长,减小MMC的不良反应,延长裸鼠生存时间,是一种有效、安全、简便的化疗方法。

关键词:丝裂霉素;纤维蛋白组织黏着剂;肝肿瘤;药物治疗法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.17.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)17-1980-03

Effects of intratumoral injection of mitomycin C mixing with fibrin glue on nude mice with liver cancer*

Yin Xiangbao, Wu Linquan, Fu Huaqun, Luo Zhiqiang, Fang Lu, Zhang Yongen

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital,

Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effects of intratumoral injection of mitomycin C mixing with fibrin glue (MMC-FG) on nude mice with liver cancer and provide experimental foundation for its clinical application. **Methods** 30 nude mice with subcutaneous human hepatoma were randomized into five groups, in which MMC-FG was injected intratumorally (group A), MMC-FG injected intraperitoneally (group B), mitomycin C (MMC) injected intratumorally (group C), normal FG injected intratumorally (group D) and normal saline injected intratumorally (group E) respectively. After administration individual tumor growth was observed, tumor weight was scaled, inhibition ratio of tumor weight was calculated, and white blood count (WBC) and platelet (PLT) of peripheral blood of nude mice were examined. Other 50 nude mice with liver cancer were randomized into five groups in the same way. Survival time of individual nude mice was observed after administration likewise. **Results** The tumor volume of nude mice in group A increased the most slowly, whose inhibition ratio of tumor weight was 53.40% and tumor weight was much lighter than that in other groups ($P < 0.05$). WBC and PLT of nude mice in group C were lower than those in group A ($P < 0.05$), while were similar with those in group B, D or group E ($P > 0.05$). Survival time of nude mice in group A was longer than that in other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Intratumoral injection of MMC-FG can inhibit tumor growth effectively, decrease toxicity of MMC, and prolong survival time of nude mice. It is an effective, safe and simple chemotherapeutic method.

Key words: mitomycin; fibrin tissue adhesive; liver neoplasms; drug therapy

原发性肝癌(以下简称肝癌)是中国一种常见的恶性肿瘤,随着现代医学诊断手段的进步及外科技术水平的提高,可手术切除的肝癌患者数量日益增多。但到目前为止,肝癌手术患者术后仍有较高的复发及转移率。如何最大限度地降低肝癌患者的术后复发及转移率仍然是研究者的不懈追求。纤维蛋白胶(fibrin glue, FG)是一种生物蛋白胶,有研究证明,FG对多种药物具有较好的缓释性^[1-3]。作者已通过体内外实验研究证实了FG对丝裂霉素(mitomycin C, MMC)具有良好的缓释性^[4]。在此研究基础上,作者进一步就丝裂霉素纤维蛋白胶凝胶(mitomycin C mixing with fibrin glue, MMC-FG)对荷肝癌裸鼠的抑瘤效果及毒副作用进行了深入研究,为其在肝癌术中化疗的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 MMC(日本协和发酵工业株式会社);FG(广州倍绣生物技术有限公司,商品名为医用生物蛋白胶);RPMI-1640培养液(美国Gibco公司);小牛血清(杭州四季青公司);胰蛋白酶(南京生兴生物技术有限公司);EDTA(青岛海泰生物技术有限公司);CO₂孵育箱(德国 Heraeus公司);超净工作台(苏州净化设备厂);光学显微镜(日本 Olympus公司);人肝癌Bel 7402细胞株(购自中科院上海细胞生物研究所,由南昌大学医学动物实验中心细胞室保种);三级BALB/c裸鼠(由南昌大学医学动物实验中心提供)。

1.2 MMC-FG的配制 将8 mg MMC加入2.5 mL FG催化剂溶解液中,摇匀使MMC充分溶解,将所得MMC溶解液加

* 基金项目:江西省科学技术厅科技计划基金资助项目(2006);江西省自然科学基金资助项目(2008GQY0050)。 作者简介:殷香保(1974~),副主任医师,主要从事肝癌的综合治疗研究。

入 FG 催化剂瓶中,振摇 10 min 使催化剂充分溶解,用 FG 专用混合注射器的催化剂管吸好;将 2.5 mL FG 主体溶解液加入 FG 主体瓶中,震摇 10 min 使主体充分溶解,用 FG 专用混合注射器的主体管吸好;将催化剂管和主体管用混合注射器的人字形针管接好,推注混合注射器使催化剂溶解液与主体溶解液充分混合,即可形成 MMC-FG。

1.3 皮下荷肝癌裸鼠模型的建立 将人肝癌 Bel 7402 细胞株从液氮中复苏、离心后,转入培养瓶中,加入适量 RPMI-1640 培养液及小牛血清,放置在 37 °C 5% CO₂ 孵育箱中培养 3~4 d,待大部分细胞贴壁生长后,在超净工作台上用吸管吸净培养液,加入适量 0.25% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 混合液,待细胞完全游离后,分装至 2 个培养瓶中,再加入适量 RPMI-1640 培养液及小牛血清,放置在 CO₂ 孵育箱中继续培养。如此反复传代至所需细胞数量,用无菌生理盐水按 1×10⁷ 个/mL 的浓度配成细胞悬液。取一定数量 4~6 周龄的三级 BALB/c 雄性裸鼠(重 18~20 g),按无菌操作原则,每只裸鼠在右侧肩胛部皮下种植细胞悬液 0.1 mL,继续饲养 2 周,即建立荷肝癌裸鼠模型(肿瘤直径约 1.0 cm)。

1.4 MMC-FG 抑瘤实验 取成功建模的皮下荷肝癌裸鼠 30 只,随机分成 5 组,每组 6 只:A 组按无菌操作原则向肿瘤内注射 MMC-FG(相当于含 MMC 0.5 mg/kg),B 组向腹腔内注射 MMC-FG(相当于含 MMC 0.5 mg/kg);C 组向肿瘤内注射浓度为 1.6 mg/mL 的 MMC 溶液(含 MMC 0.5 mg/kg),D 组向腹腔内注射 FG(5.0 mL/kg),E 组向肿瘤内注射无菌生理盐水(0.3 mL/kg)。每 3 天给药 1 次,共 3 次。首次给药当天开始每 2 天用游标卡尺测量肿瘤的长径和垂直径,用公式:体积=(长径×垂直径²)/2 计算肿瘤的体积。至第 12 天拉颈处死裸鼠,完整剥离肿瘤并称取肿瘤重量,用公式:瘤重抑制率=(1-实验组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100% 计算瘤重抑制率。同时经眶静脉采集裸鼠外周血液,检测白细胞(white blood count, WBC)及血小板(platelet, PLT)。

1.5 荷瘤裸鼠的生存时间 另取成功建模的皮下荷肝癌裸鼠 50 只,随机分成 5 组,每组 10 只,分组和给药方法同前。观察各组裸鼠生长情况,为期 40 d(从首次给药当天开始计算),记录各组裸鼠存活天数。

1.6 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行处理,均数比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肿瘤生长情况 各组肿瘤生长情况比较见表 1。

2.2 肿瘤重量及瘤重抑制率 A 组肿瘤重量与 B、C 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),表明瘤内注射 MMC-FG 的抑瘤效果优于腹腔内注射 MMC-FG 或瘤内注射 MMC 溶液。B、C 组与 D、E 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),表明腹腔内注射 MMC-FG 或瘤内注射 MMC 溶液均有一定的抑瘤作用。首次给药后第 12 天各组肿瘤重量和瘤重抑制率见表 2。

2.3 荷瘤裸鼠的血象变化 裸鼠给药后 12 d 外周血液 WBC 及 PLT 均不同程度低于给药前,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。给药前及给药后第 12 天,C 组裸鼠外周血液 WBC 及 PLT 检测低于 A 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明瘤内注射 MMC-FG 对骨髓造血系统的毒副作用显著小于瘤内注射 MMC 溶液。A、B 组裸鼠 WBC 及 PLT 稍低于 D、E 组,但

差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

2.4 荷瘤裸鼠的生存时间 给药期间各组裸鼠均无死亡。实验第 40 天,A 组仍有 2 只裸鼠存活,B、C、D、E 组分别于实验第 33、36、37、39 天全部死亡。A 组裸鼠的生存时间长于 B、C、D、E 组($P < 0.05$)。B、C、D 组裸鼠的生存时间与 E 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

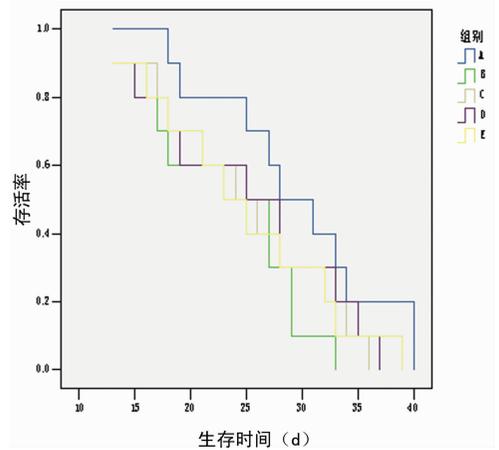


图 1 荷瘤裸鼠的生存时间

表 1 各组肿瘤生长情况比较 (cm³)

时间(d)	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
0	1.04	0.98	1.02	1.04	1.05
2	1.15	1.16	1.23	1.31	1.33
4	1.20	1.32	1.40	1.58	1.69
6	1.31	1.51	1.73	1.91	1.98
8	1.34	1.80	2.02	2.47	2.61
10	1.55	2.08	2.38	3.15	3.21
12	1.93	2.8	3.13	4.06	4.14

表 2 首次给药后第 12 天各组肿瘤重量和瘤重抑制率

组别	肿瘤重量(g)	瘤重抑制率(%)
A 组	2.12±0.52*	53.40
B 组	3.08±0.75#	32.36
C 组	3.44±0.61#	24.38
D 组	4.25±0.78	—
E 组	4.55±0.83	—

*: $P < 0.05$, 与 B、C、D、E 组比较; #: $P < 0.05$, 与 D、E 组比较; —: 此项无数据。

表 3 首次给药前及给药后第 12 天各组荷瘤裸鼠血象比较

组别	WBC(×10 ⁹ /L)		PLT(×10 ⁹ /L)	
	给药前	给药后 12 d	给药前	给药后 12 d
A 组	7.98±1.63	6.47±1.58*	223.4±51.5	167.5±42.6*
B 组	8.21±1.41	7.02±1.37#	212.7±48.6	171.4±36.9#
C 组	8.32±1.56	4.97±1.39#	225.4±51.8#	123.9±35.7#
D 组	8.13±1.72	7.89±1.57#	229.4±58.6	192.8±51.3#
E 组	8.16±1.77	7.92±1.60#	232.1±60.3	201.4±52.8#

*: $P < 0.05$, 与 C 组比较; #: $P < 0.05$, 与 E 组比较。

3 讨 论

众所周知,肝癌恶性程度高,预后差,即使获得根治性切除,5年内仍有50%患者出现复发或转移^[5-7]。目前,化学治疗仍然是治疗肝癌的重要手段。传统的全身化疗方法存在以下缺点:(1)药物经静脉注射进入机体后,缺乏对肿瘤组织的选择性,全身血药浓度在短时间内远远超过中毒浓度,引起相应的毒副作用;(2)常规化疗药物在机体内半衰期较短,发挥作用的时间短暂,影响化疗效果。因此,多数学者已不主张对肝癌患者行全身化疗。目前,临床上肝癌患者多采用区域性化疗,如肝动脉栓塞化疗(transcatheter hepatic arterial chemoembolization, TACE)、肝动脉和(或)门静脉置管化疗等^[8]。这些化疗方法使药物主要集中在肝脏发挥作用,疗效较全身化疗有明显改善。但这些化疗方法往往需要经特定的介入性操作才能实现,技术要求较高,且费用昂贵,难于在基层医院普及。

FG是一种生物蛋白制剂,临床上广泛用于促进创面止血、封闭组织缺损、促进伤口愈合、防止组织粘连等^[9-12]。其作用原理是利用参与凝血的有关成分,模拟机体凝血过程的最后阶段形成纤维蛋白凝胶。FG形成凝胶后,在机体内具有相对稳定性,一般在1周左右逐渐被机体纤溶系统降解吸收。近年来,国内外有研究者利用FG能包裹药物及在体内分解缓慢的特点,将其作为某些抗肿瘤药、抗菌药物、血管内皮细胞生长因子等药物的缓释载体,取得了较好的效果^[13-15]。本研究结果显示,裸鼠肝癌瘤内注射MMC-FG的抑瘤效果显著优于单纯MMC-FG,且对裸鼠骨髓造血系统的毒副作用显著小于单纯MMC-FG,并能有效延长荷瘤裸鼠的生存时间。其原因可能是FG的包裹作用能使MMC集中在肿瘤内缓慢发挥抗肿瘤作用,延长了MMC的有效作用时间;同时,FG作为MMC的缓释载体大大减少了MMC在裸鼠全身血液中的峰浓度,降低了MMC全身毒副作用。当然,采用FG作为包裹载体的方法也有一定的弊病,如可能引起压力增高,反而促使肿瘤破裂扩散;药物甚至进入血循环,加重药物的毒副作用,实验时需密切观察。

MMC是头状链霉素产生的一种广谱抗肿瘤抗菌药物,是肝癌化疗常用药物之一。其作用机制是分子式中的烷化基团与DNA链中鸟嘌呤上的N₇结合,形成链间交叉连结,使DNA解聚,阻止DNA复制。体外实验证明,MMC对肝癌细胞具有很强的杀伤作用。但它在体内的代谢非常迅速,血浆半衰期只有0.5~1h,在很大程度上影响了其临床疗效;同时,MMC的骨髓抑制作用较重,胃肠道反应及肝、肾功能损害也是化疗过程中经常遇到的问题。作者之所以选择MMC作为被承载的化疗药物,主要原因有:(1)MMC是治疗肝癌的经典化疗药物之一,其抗癌效果好;(2)MMC的毒副作用,尤其是骨髓抑制作用较大,易于显示FG降低其不良反应的优势;(3)MMC的常规用量小,易于被FG包裹。

参考文献:

[1] Woodruff MA, Rath SN, Susanto E, et al. Sustained release and osteogenic potential of heparan sulfate-doped fi-

brin glue scaffolds within a rat cranial model[J]. *J Mol Histol*, 2007, 38(3): 425-433.

- [2] Spicer PP, Mikos AG. Fibrin glue as a drug delivery system[J]. *J Control Release*, 2010, 148(1): 49-55.
- [3] Cruysberg LP, Nuijts RM, Gilbert JA, et al. In vitro sustained human transscleral drug delivery of fluorescein-labeled dexamethasone and methotrexate with fibrin sealant[J]. *Curr Eye Res*, 2005, 30(5): 653-660.
- [4] 殷香保, 王捷, 伍衡, 等. 丝裂霉素纤维蛋白胶凝胶化疗的缓释特性[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(5): 542-545.
- [5] 汤钊猷. 开展肝癌转移复发研究的意义与途径[J]. *中华普通外科杂志*, 2006, 21(6): 761-763.
- [6] 刘德华, 华阳, 王少雷, 等. 肝动脉栓塞化疗与灌注化疗介入治疗结肠癌肝转移瘤的临床研究[J]. *中国全科医学*, 2006, 9(3): 211-212.
- [7] 丛文铭, 董辉, 王斌, 等. 复发性肝癌临床病理特点与发生方式探讨[J]. *中国实用外科杂志*, 2009, 29(1): 71-73.
- [8] 罗嘉, 吴飞跃, 汤明. 复发性小肝癌再次手术和消融栓塞治疗的探讨[J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(7): 676-679.
- [9] Ren J, Wu X, Hong Z, et al. Management of a patient with colocolic fistula by autologous platelet-rich fibrin glue[J]. *Am Surg*, 2012, 78(1): 86-87.
- [10] Yang Y, Sun M, Hou R, et al. Preliminary study of fibrin glue combined with pingyangmycin for the treatment of venous malformations in the oral and maxillofacial region[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2008, 66(16): 2219-2225.
- [11] Nahas FX, di Martino M, Ferreira LM. Fibrin glue as a substitute for quilting suture in abdominoplasty[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2012, 129(2): 212-213.
- [12] Prieto-Díaz-Chávez E, Medina-Chávez JL, Ramírez-Barba EJ, et al. Reduction of peritoneal adhesion to polypropylene mesh with the application of fibrin glue[J]. *Acta Chir Belg*, 2008, 108(4): 433-437.
- [13] Stanojkovic Z, Stanojevic G, Stojanovic M, et al. Determination of fibrin glue with antibiotics on collagen production in colon anastomosis[J]. *Vojnosanit Pregl*, 2008, 65(6): 681-687.
- [14] Lee HH, Haleem AM, Yao V, et al. Release of bioactive adeno-associated virus from fibrin scaffolds; effects of fibrin glue concentrations[J]. *Tissue Engineering*, 2011, 28(17): 1969-1978.
- [15] Schillinger U, Wexel G, Hacker C, et al. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors[J]. *Pharm Res*, 2008, 25(18): 2946-2962.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-01-22)