

• 基础与实验研究 •

Zirconium dioxide nanoparticle loaded doxorubicin administered through different ways for treatment of hepatic VX2 transplanted tumor in rabbit models

ZHAO Fan*

(Department of Ultrasound, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective** To compare tumor growth and drug targeting of zirconium dioxide nanoparticles loaded doxorubicin (DOX@ZrO₂) and free doxorubicin (DOX-Free) administered through different routes of hepatic VX2 transplanted tumor in rabbit models. **Methods** A total of 25 rabbit models of hepatic VX2 transplanted tumor were established and randomly divided into 5 groups, including group A (DOX@ZrO₂ via hepatic artery), group B (DOX@ZrO₂ via peripheral vein), group C (DOX-free via hepatic artery), group D (DOX-free via peripheral vein) and group E (untreated group). Tumor volumes were measured with CT scanning 1 day, 3 days and 6 days after drug administration, and the ratio of tumor volume were compared between 3 days and 1 day, 6 days and 3 days, as well as 6 days and 1 day. One-way ANOVA analysis was used for multi-group comparison and LSD or SNK method was used for pairwise comparison. Histological observations of isolated heart specimen were performed to evaluate the cardiotoxicity of the drug in each group. **Results** There was no statistic difference of tumor volume ratio between 3 days and 1 day, nor between 6 days and 3 days ($F=2.056, 1.906, P=0.125, 0.149$), while statistic difference of tumor volume ratio was found between 6 days and 1 day after drug administration ($F=4.230, P=0.012$). The tumor volume ratio in group A was significantly lower than that in the other groups ($P<0.05$). There was no statistic difference of pairwise comparison among B, C, D and E groups (all $P>0.05$) except between group B and E. Histological observation showed that the myocardium of group A and group B was just a little or no damage, while of group C and group D were severe damaged. **Conclusion** Combining traditional super selective hepatic arterial chemotherapy targeting surgical treatment method with nano drug carrier, tumor growth of hepatic VX2 transplanted tumor in rabbit model can be delayed, and the drug targeting can be improved. Moreover, the cardiotoxicity caused by doxorubicin can be effectively reduced.

[Keywords] liver neoplasms; rabbits; zirconium dioxide nanoparticle; doxorubicin; drug delivery systems

DOI:10.13929/j.1672-8475.201807011

二氧化锆纳米颗粒荷载阿霉素经不同途径 给药治疗兔 VX2 肝移植瘤

赵 璠*

(中国医科大学附属盛京医院超声科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘 要] **目的** 比较经不同途径给药后载阿霉素(DOX)的二氧化锆纳米颗粒及游离 DOX 兔 VX2 肝移植瘤生长情况及药物靶向性。**方法** 建立兔 VX2 肝移植瘤模型 25 只,随机分为 5 组,A 组经肝动脉给予载 DOX 二氧化锆纳米颗粒,B

[第一作者] 赵璠(1989—),女,辽宁营口人,硕士,医师。研究方向:超声诊断。

[通信作者] 赵璠,中国医科大学附属盛京医院超声科,110001。E-mail: 529836960@qq.com

[收稿日期] 2018-07-10 **[修回日期]** 2018-08-25

组外周静脉给予载 DOX 二氧化锆纳米颗粒, C 组经肝动脉给予游离 DOX, D 组经外周静脉给予游离 DOX, E 组为空白对照组。通过 CT 检查测量给药后 1、3、6 天各组同期肿瘤体积, 分别计算各组 3 天与 1 天、6 天与 3 天、6 天与 1 天肿瘤体积比。多组间肿瘤体积比比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法或 SNK 法。对给药后各组模型的离体心脏标本进行组织学观察, 评价药物的心脏毒性。**结果** 各组间给药后 3 天与 1 天肿瘤体积比、6 天与 3 天肿瘤体积比差异均无统计学意义($F=2.056, 1.906, P=0.125, 0.149$); 而各组间给药后 6 天与 1 天肿瘤体积比差异有统计学意义($F=4.230, P=0.012$), A 组明显低于其他组(P 均 <0.05), 且除 B 组与 E 组外, B、C、D、E 组间两两比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。组织学检查显示, A 组及 B 组心肌几乎无损伤或损伤较轻, 而 C 组及 D 组心肌损伤均较重。**结论** 纳米药物载体与传统介入超选择性肝动脉化疗相结合, 可更好地延缓兔 VX2 肝移植瘤生长, 提高药物靶向性, 且有助于降低 DOX 造成的心脏毒性。

[关键词] 肝肿瘤; 兔; 二氧化锆纳米颗粒; 阿霉素; 药物释放系统

[中图分类号] R-332; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2019)05-0299-05

对无法手术切除的中晚期肝癌或术后复发肝癌患者, 目前临床常采用传统化疗法或经肝动脉化疗方法^[1]。因多数抗癌药物不能很好地区别肝癌细胞与正常细胞, 导致系统性毒性和负面影响, 使得传统化疗方法受到一定局限。阿霉素(doxorubicin, DOX)为蒽环类抗肿瘤抗生素, 是较常用的传统化疗药物, 广泛用于治疗各种肿瘤, 包括乳腺、肺和甲状腺等部位恶性肿瘤, 但具有较强的心脏毒性^[2-4], 用于全身及局部化疗可引起心肌病变和充血性心力衰竭。另外, 传统介入治疗将化疗药物直接经肝动脉注入, 因血流供应不稳定及血管内流体静压较高, 使得仅有小部分化疗药物可有效到达肿瘤部位。

作为一种新型靶向化疗药物载体, 中空纳米颗粒具有较高的比表面积和介孔结构, 且空隙率高, 可将大量化疗药物装载于纳米颗粒内部或附着于其表面, 通过主动靶向或被动靶向的方式使药物进入细胞, 提高化疗效果^[5-6]。近年来, 二氧化锆作为新型纳米材料已在牙科学和骨科领域广泛应用, 但少见以其作为药物载体治疗肿瘤的报道^[7-8]。本研究采用装载化疗药物 DOX 的二氧化锆纳米颗粒及游离 DOX 治疗兔 VX2 肝移植瘤, 比较经肝动脉及传统外周静脉途径给药对肿瘤的靶向性及抑瘤效果, 并探讨二氧化锆纳米颗粒载 DOX 是否可因二氧化锆的药物靶向性而降低 DOX 的心脏毒性。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立 纯种新西兰大白兔 26 只[批准号: (2013)2013-112-2 号], 雌雄不拘, 体质量 2.0~2.5 kg。将 VX2 荷瘤瘤株置于 37℃ 恒温水浴箱 20 min 进行复苏。在无菌条件下将瘤株剪碎, 而后任选 1 只实验兔, 以 20 ml 注射器吸取剪碎的瘤株组织块, 直接注射至其双侧后腿肌肉内。10~15 天后, 待实验兔后腿内生长出实性肿块后, 取出瘤块, 选取周围

新鲜、生长较为旺盛的鱼肉样组织, 以外科剪制成 1~2 mm 瘤块, 用于建立兔 VX2 肝移植瘤模型^[9-10]。

建模时, 采用 Philips iU22 型号超声扫描仪, 腹部探头(频率 3.0~5.0 MHz), 进行定位并引导穿刺。将实验兔全身麻醉后仰卧保定于自制操作台, 剑突下备皮、消毒, 超声实时引导下, 将 18G 穿刺针送至预定种植部位, 取 1 或 2 个瘤块种植于兔肝内。瘤块种植后 10~15 天, 经 CT 扫描证实 25 只兔建模成功。

1.2 分组处理 将 25 只 VX2 肝移植瘤模型兔随机分为 5 组, 每组 5 只。A 组经肝动脉给予载 DOX 二氧化锆纳米颗粒, B 组外周静脉给予载 DOX 二氧化锆纳米颗粒, C 组经肝动脉给予游离 DOX, D 组经外周静脉给予游离 DOX, E 组为空白对照组。其中 A、B 组载 DOX 二氧化锆纳米颗粒剂量为 3.7 mg/kg 体质量(所含 DOX 剂量相当于 1.75 mg/kg 体质量), C、D 组游离 DOX 剂量为 1.75 mg/kg 体质量; E 组不做任何处理。

1.2.1 经肝动脉给药 采用 Siemens Artis DTA DSA 数字减影血管造影机, 对 A、C 组经肝动脉途径给药。将模型兔全身麻醉后仰卧保定于自制操作台, 确定其右侧股动脉搏动部位, 并对右侧后腿内侧区域备皮、消毒、铺巾。沿股动脉搏动部位钝性分离, 剥离股动脉。以 18G 穿刺针穿刺股动脉, 而后引入 5F 导管鞘, 行腹腔干造影显示肝内血管, 将微导丝超选择至肿瘤供血动脉, 造影明确供血动脉, 经导管分别注入载 DOX 二氧化锆纳米颗粒及游离 DOX。术毕加压包扎并缝合^[11]。

1.2.2 经外周静脉给药 对 B、D 组经耳缘静脉分别注入载 DOX 二氧化锆纳米颗粒及游离 DOX。

1.3 影像学评价 采用 Toshiba Aquilion 64 排螺旋 CT 扫描仪, 给药后 1、3、6 天对各组行 CT 检查, 观察肿瘤生长情况及载 DOX 二氧化锆纳米颗粒影像学表现, 选取肝内肿瘤最大层面测量病灶长径及短径, 计算

肿瘤体积, 体积 = $0.5 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$, 并分别计算 3 天与 1 天、6 天与 3 天、6 天与 1 天肿瘤体积比。

1.4 组织学检查 于末次 CT 检查后处死模型兔, 取出心脏组织, 固定后沿轴位方向切成 5 mm 薄片, 将标本于 4% 甲醛溶液中浸泡 2 天后取出, 进行石蜡包埋。采用 Nikon Eclipse TS100-F 显微镜, 对比观察各组心脏标本组织学表现。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计分析软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析比较各组间肿瘤体积比的差异, 两两比较采用 LSD 或 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

给药后各时间点 CT 检查均显示载 DOX 二氧化锆纳米颗粒在肝肿瘤病灶内呈略高密度影(图 1)。各组兔 VX2 肝移植瘤模型 6 天内肿瘤体积持续增大, 但增大程度不同, 见表 1。各组间给药后 3 天与 1 天肿瘤体积比、6 天与 3 天肿瘤体积比差异均无统计学意义($F = 2.056, 1.906, P = 0.125, 0.149$), 给药后 6 天与 1 天肿瘤体积比差异有统计学意义($F = 4.230, P = 0.012$); 两两比较显示, A 组与 B 组间($P = 0.012$)、A 组与 C 组间($P = 0.019$)、A 组与 D 组间($P = 0.024$)、A 组与 E 组间($P = 0.001$)及 B 组与 E 组间($P = 0.029$)差异均有统计学意义, 而 B 组与 C 组间($P =$

0.358)、B 组与 D 组间($P = 0.420$)、C 组与 D 组间($P = 0.907$)、C 组与 E 组间($P = 0.176$)及 D 组与 E 组间($P = 0.143$)差异均无统计学意义。

组织学检查显示, E 组心肌细胞结构正常(图 2A), 与之相比, A 组心肌细胞几乎无损伤(图 2B), B 组仅见心肌轻度扩张(图 2C), C 组可见心肌纤维断裂, 心肌细胞变形, 出现明显细胞水肿, 细胞核位于一侧(图 2D), D 组可见明显心肌扩张及细胞核变形(图 2E)。

3 讨论

近年来, 联合应用载药纳米颗粒与介入治疗方法(如肝动脉化疗灌注、肝动脉栓塞、微波消融、射频消融等)治疗肿瘤的研究报道^[12]逐渐增多。纳米颗粒可作为靶向化疗药物的载体, 利用其良好的靶向性、缓释性、生物相容性及生物降解性, 提高化疗药物的靶向性, 以达到更有效地抑制肿瘤生长的目的^[13]。

载 DOX 二氧化锆纳米颗粒经肝动脉给药后到达肿瘤部位, 并释放 DOX, 使 DOX 在局部动脉血中达到较高的药物浓度, 可提高其抗肿瘤作用^[14]。本研究结果显示, 载 DOX 二氧化锆纳米颗粒 CT 呈略高密度(图 1), 经肝动脉给药后 6 天, 兔 VX2 肝移植瘤虽然仍持续生长, 但肿瘤内高密度的载 DOX 二氧化锆纳米颗粒周围出现近似环形低密度区(图 1), 为肿瘤坏死区。

表 1 各组 VX2 肝移植瘤模型兔不同时间肿瘤体积及体积比($\bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤体积(mm ³)			肿瘤体积比		
	1 天	3 天	6 天	3 天与 1 天	6 天与 3 天	6 天与 1 天
A 组	5 471.86 ± 4.35	6 758.34 ± 2.27	9 988.37 ± 7.33	1.27 ± 0.08	1.46 ± 0.40	1.85 ± 0.45
B 组	5 497.35 ± 4.16	10 335.51 ± 6.61	17 498.40 ± 1.31	2.05 ± 0.46	1.64 ± 0.23	3.32 ± 0.72
C 组	3 090.66 ± 2.00	8 132.92 ± 6.34	10 820.87 ± 6.30	2.39 ± 0.82	1.54 ± 0.43	4.18 ± 0.98
D 组	5 329.43 ± 3.30	10 513.74 ± 8.42	20 258.65 ± 1.29	2.12 ± 0.85	2.30 ± 1.35	3.88 ± 0.91
E 组	4 900.73 ± 2.61	13 853.18 ± 1.19	28 445.97 ± 1.69	2.62 ± 1.12	2.51 ± 0.79	4.76 ± 1.56

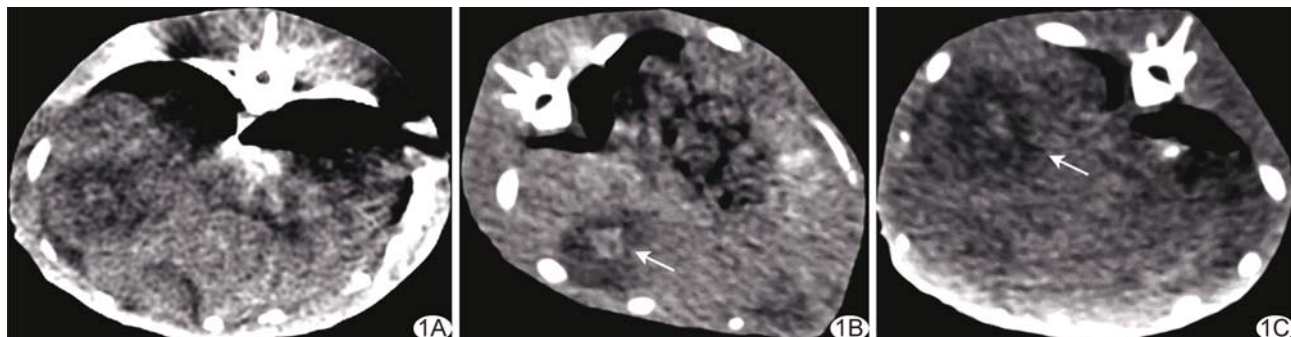


图 1 载 DOX 二氧化锆纳米颗粒经肝动脉注入兔 VX2 肝移植瘤后不同时间 CT 图像 A、B. 给药后 1 天(A)及 3 天(B), 载 DOX 二氧化锆纳米颗粒在病灶内呈略高密度影(箭); C. 给药后 6 天, 病灶内载 DOX 二氧化锆纳米颗粒周围出现近似环形低密度区(箭)

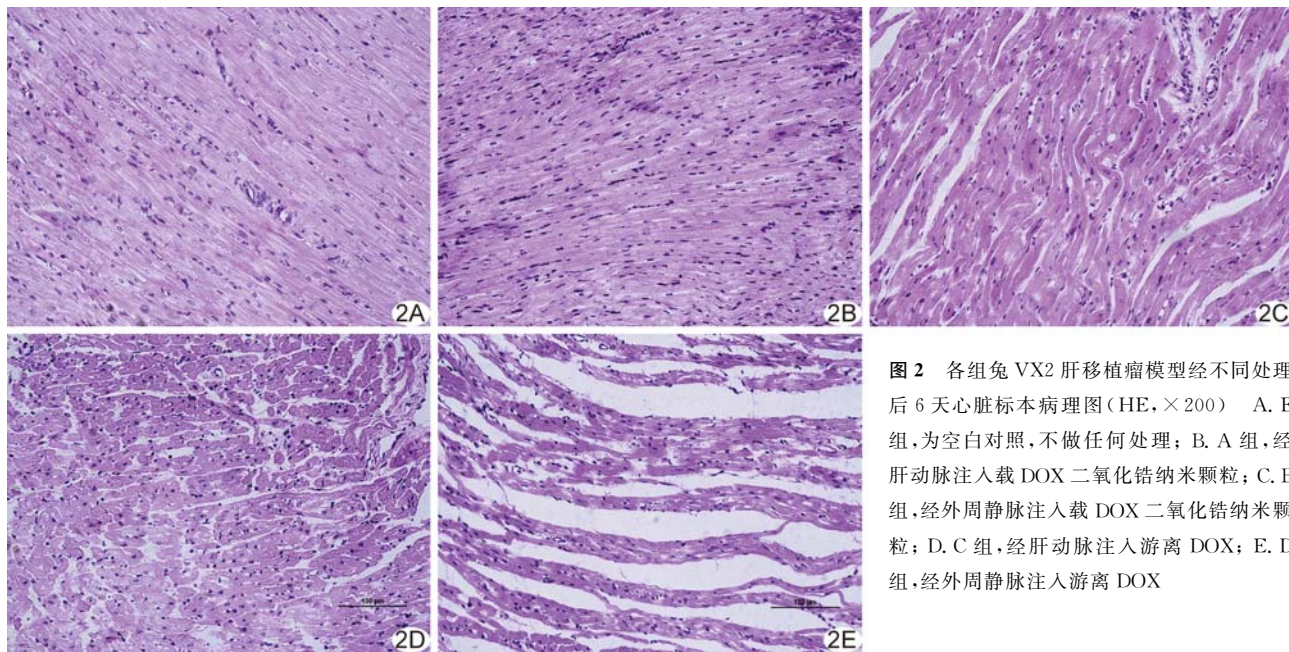


图2 各组兔 VX2 肝移植瘤模型经不同处理后 6 天心脏标本病理图(HE, ×200) A. E 组, 为空白对照, 不做任何处理; B. A 组, 经肝动脉注入载 DOX 二氧化锆纳米颗粒; C. B 组, 经外周静脉注入载 DOX 二氧化锆纳米颗粒; D. C 组, 经肝动脉注入游离 DOX; E. D 组, 经外周静脉注入游离 DOX

表面被修饰后的纳米颗粒可通过被动-主动靶向作用及受体-配体作用, 在体内实现对肿瘤的趋向, 但易聚集于网状内皮系统丰富的组织器官。通过外周静脉给药后, 载 DOX 二氧化锆纳米颗粒经全身血液循环到达肝内^[15], 在此过程中, 部分纳米颗粒被其他脏器的网状内皮系统吞噬并释放 DOX, 影响肝内病灶局部的药物浓度, 使其治疗效果不及经肝动脉给药。本研究中, A 组给药后 6 天与 1 天肿瘤体积比明显低于 B 组。游离 DOX 经肝动脉及外周静脉给药后, 因其药物靶向性较差, 随血液循环分布于全身各组织器官, 无法实现肝内局部化疗目的, 治疗效果不佳。本研究中 A 组和 B 组给药后 6 天与 1 天肿瘤体积比均明显低于 E 组, 而 C 组和 D 组均与 E 组间差异无统计学意义。通过介入手段, 经肝动脉将化疗药物超选择性靶向注入肿瘤供血动脉, 有利于提高化疗药物的靶向性。

DOX 具有较强的心脏毒性。本研究组织学检查发现, C 组和 D 组心肌损伤程度相对于 A 组和 B 组更为严重, 可见明显的细胞水肿、心肌纤维断裂及心肌扩张, 而 A 组心肌细胞几乎无损伤, 提示载 DOX 二氧化锆纳米颗粒无论是通过肝动脉途径还是外周静脉给药均较游离 DOX 更有利于降低 DOX 的心脏毒性; 此外, 载 DOX 二氧化锆纳米颗粒经肝动脉给药引起的心肌细胞损伤较经外周静脉给药更轻微。

总之, 本研究通过在体动物实验发现, 纳米药物载体与传统介入超选择性肝动脉化疗相结合, 可更好地延缓肿瘤生长, 提高药物靶向性, 并有效降低 DOX 造成的荷 VX2 肝移植瘤兔心脏毒性。

【参考文献】

- [1] Lin S, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Liver Cancer*, 2012, 1 (3-4): 144-158.
- [2] Jain V, Jain S, Mahajan SC. Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment. *Curr Drug Deliv*, 2015, 12(2):177-191.
- [3] Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(2):157-170.
- [4] Thomas MB, OBeirne JP, Furuse J, et al. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: Cytotoxic chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15 (4): 1008-1014.
- [5] Mendes LP, Delgado JM, Costa AD, et al. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*, 2015, 29 (6):1268-1274.
- [6] Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A, et al. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12(7):408-424.
- [7] Guess PC, Att W, Strub JR. Zirconia in fixed implant prosthodontics. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2012, 14 (5): 633-645.
- [8] Wang X, Chen D, Cao L, et al. Mesoporous titanium zirconium oxide nanospheres with potential for drug delivery applications. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5(21):10926-10932.
- [9] 苏静, 陈文直, 王嫣, 等. 兔 VX2 肌肉肿瘤模型的建立及生物学特性. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(11):2129-2132.

- [10] 陈松旺,周云,孟凡荣,等.开腹及超声引导下深植入法和浅植入法建立兔肝 VX2 肿瘤模型的比较.中国医疗设备,2011,26(8):21-24.
- [11] 江雄鹰,罗荣光,黄金华,等.兔 VX2 肝癌模型建立与经兔股动脉微导管超选择性肝左动脉插管技术的探讨.介入放射学杂志,2011,20(3):214-217.
- [12] Shao HB, Ma TC, Hong D, et al. Combination of multifunctional nanoparticles and interventional techniques makes each other going further in the field of cancer treatment. Curr Drug Metab, 2018, 19(2):94-99.
- [13] Longfei Tan, Tianlong Liu, Changhui Fu, et al. Hollow ZrO₂/PPy nanoplatfom for improved drug delivery and real-time CT monitoring in synergistic photothermal-chemo cancer therapy. Journal of Materials Chemistry B, 2016, 4(5):859-866.
- [14] Shi H, Niu M, Tan L, et al. A smart all-in-one theranostic platform for CT imaging guided tumor microwave thermotherapy based on IL@ZrO₂ nanoparticles. Chem Sci, 2015, 6(8):5016-5026.
- [15] 王蓉,原永芳.纳米载药系统在静脉注射药物中的应用.中国现代应用药,2010,27(3):206-209.

《中国介入影像与治疗学》投稿要求(三)

15 计量单位 采用国际单位制并严格执行国家标准 GB 3100~3201《量和单位》的规定,使用法定计量单位,不再使用 N(当量浓度)、M(克分子浓度)、百分比浓度[% (V/V)、%(m/m)]等已废除的非标准计量单位和符号。

16 统计学符号 以国家标准 GB/T 3358.1-1993《统计学名词及符号》为准,样本算术平均数用英文小写斜体 $\bar{x}$;标准差用英文小写斜体 s ; t 检验用英文小写 t ; F 检验用英文大写 F ;卡方检验用希文斜体 χ^2 ;相关系数用英文小写斜体 r ;自由度用希文斜体 γ ;概率用英文大写斜体 P ;样本数用英文小写斜体 n 。

17 统计学方法 需注明使用的统计学软件名称和版本,以及所使用的统计学方法。率的计算保留小数点后两位,年龄需要提供 $\bar{x}$ 或者中位年龄,保留小数点后一位。

18 图片 研究论著类论文和短篇报道均需附有相应患者的影像学资料,图片分辨率应在 300 dpi 以上, JPG/JEPG 格式,有良好的清晰度和对比度,最好是医院图像工作站中直接提取的图像。每图下面应标有图序号、图题、图说(解释图片内容的文字),文中应有图位。图中箭示或文字应有说明,病理图应注明染色方法及放大倍数。

19 表格 本刊采用三线表,表格列于文后,每表应标有表序号、表题,文中应有表位。

20 参考文献 严格按照国家标准 GB 7714-2015《文后参考文献著录规则》中规定,采用“顺序编码制”。仅限于作者直接阅读的近 5 年的文献,尽量不用二次文献,无特殊需要不必罗列众所周知的教科书或某些陈旧史料,提倡引用国内外同行新近发表的研究论文为参考文献,引用论点必须准确无误,不能断章取义。除短篇报道外,论文参考文献应至少来源于 5 种以上的期刊,研究论著类论文参考文献不少于 13 条,综述类论文参考文献应在 20 条以上,以反映论文的科学依据,以及对前人科学工作的继承性。参考文献的编排应按每条文献在文中出现的先后顺序逐条列于文后,并在文内引用处用右上角加方括号注明角码。参考文献书写格式如下:

- [1] Lopera JE, Trimmer CK, Lamba R, et al. MDCT angiography of mesenteric bypass surgery for the treatment of chronic mesenteric ischemia. AJR Am J Roentgenol, 2009, 193(5):1439-1445.
- [2] 李雷,王文辉,邹英华,等.症状性下肢动脉疾病与肾动脉狭窄的相关性.中国介入影像与治疗学,2013,10(6):325-328.