

渗透泵强化对流释放给药治疗恶性脑胶质瘤的裸小鼠模型

黄军¹, 龙小艳¹, 李波¹, Yan Michael Li², Walter A Hall², 刘定阳¹, 刘庆¹, 王君宇¹, 袁贤瑞^{1*}

1. 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008

2. 纽约州立大学上州医科大学医院, 纽约 雪城 13210

摘要: **目的** 探寻渗透泵强化对流释放给药治疗脑肿瘤的裸小鼠模型, 为新药的临床前期应用提供良好的实验动物模型。 **方法** 14 只裸小鼠基底节区种植 4×10^5 个人胶质瘤 U87 细胞, 并安置渗透泵强化对流释放给药系统。裸小鼠按体重和活体荧光信号强度分为二组: 治疗组 ($n = 7$) 的泵内注入 100 μl (1 μg) 的 DTATEGF, 对照组 ($n = 7$) 泵内注入 100 μl (1 μg) 的无关毒素 DT。观察动物的生长特征, Kaplan-Meier 生存曲线分析和脑内肿瘤的病理学特征。 **结果** 实验动物没有与渗透泵及外科手术相关的病残和病死发生。动物对渗透泵给药系统耐受好, 无抓搔及渗透泵脱位, 伤口无感染及裂开等情况。Kaplan-Meier 生存曲线显示治疗组动物的中位生存期较对照组明显延长, 差异有显著性。(治疗组 126 天 vs. 对照组 68 天, $P = 0.0002$)。治疗组中有两只小鼠生存期超过 180 天。病理学检测裸小鼠脑内种植生长的肿瘤与人类胶质母细胞瘤的病理特征极为相似。 **结论** 该裸小鼠实验动物模型简便、实用、可靠, 适用于新的药物包括单克隆抗体、靶向小分子、肿瘤疫苗等通过强化对流投递治疗脑内恶性肿瘤的临床前期应用。

关键词: 动物模型; 脑胶质瘤; 免疫毒素; 强化对流释放给药

Convection-enhanced delivery via a mini-osmotic pump system in the mouse xenograft model

HUANG Jun¹, LONG Xiaoyan¹, LI Bo¹, LI Michael Yan², HALL A Walter², LIU Dingyang¹, LIU Qing¹, WANG Junyu¹, YUAN Xianrui¹. 1 Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, 2 SUNY Upstate University Hospital, Syracuse, NY 13210.

Abstract: **Objective** To develop a brain tumor model in mouse where drugs could be convection-enhanced delivered via a mini-osmotic pump directly into a pre-established tumor bed. **Methods** Supratentorial tumors were established in 14 cases athymic nude mice which xenografts with luciferase-modified human glioblastoma U87 cells lines and a mini-osmotic pump for convection-enhanced delivery therapeutic drugs were implanted into the body of the mice, the mice were subsequently assigned randomly to control and DTATEGF treatment groups, and the survival time were analyzed using Kaplan-Meier survival curve. **Results** There were no noticeable side effects of maintaining the device in place for long periods of time. The device never moved or came off the scalp, all nude mice tolerated the device well. No morbidity or mortality was observed, and no infections were seen. Survival analysis revealed that the median survival of mice treated with DTATEGF was significantly extended relative to controls (126 days vs. 68 days, $P = 0.0002$). Histopathologic analysis revealed tumor growth within the cerebral in all mice. **Conclusions** This model is well suited for pre-clinical testing of the effects of various treatment strategies on established brain tumors in a mouse model which more closely simulates the clinical situation. The results of these experiments indicate that DTATEGF can be delivered by convection-enhanced delivery (CED) via micro-osmotic pump to intracranial tumor and be successful in providing additional survival benefit.

Key words: Brain tumor model; Convection-enhanced delivery; Immunotoxin; Glioma

原发性恶性脑胶质瘤 (WHO III、IV 级) 是成人最常见的颅内肿瘤, 治疗困难、预后差, 即使联合

手术、放疗和化疗, 其中位生存期仍仅为 14 个月左右^[1]。尽管目前已有多种药物在体外和动物实验

收稿日期: 2012-06-25; 修回日期: 2012-08-04

作者简介: 黄军 (1968 -), 男, 医学博士, 副主任医师。主要从事神经外科基础与临床研究。

通讯作者: 袁贤瑞, 男, 教授, 科主任, 博士生导师, 主要从事神经肿瘤临床研究。

中证实具有显著的抗胶质瘤活性,但在人体内却无法取得类似的效果,这可能与传统的全身给药方式因血脑屏障的限制和全身的毒性反应影响药物的效果有关^[2,3]。药物的强化对流释放(Convection-enhanced Delivery, CED)给药方式治疗恶性脑胶质瘤是通过持续、轻度正压灌注技术将药物直接释放至肿瘤内和瘤周组织间的一种技术^[3,6]。这一技术能使药物在局部形成高浓度,同时克服药物在全身用药时的毒副作用和不能透过血脑屏障的局限性。目前实验应用 CED 方法时,多通过注射器或导管多次给药,并多采用大鼠模型,不但因多次操作增加了难度和误差,且大动物费用高,掌控有一定的困难,缺乏有关裸小鼠的脑内原位种植肿瘤,渗透泵强化对流释放给药系统安置的详细资料^[7-10]。

本实验中我们详细描述了裸小鼠的脑内原位种植肿瘤模型的建立及渗透泵强化对流释放给药系统的安装,并观察了通过该系统投递免疫毒素 DTATEGF(新合成的一种毒素名称)对裸小鼠脑内原位种植人脑胶质瘤的疗效,为新药物利用渗透泵强化对流释放给药系统治疗脑恶性肿瘤的临床前期研究提供实用、经济、可靠的动物模型。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

转染有荧光素酶基因的人脑胶质瘤 U87 细胞系由 Memorial Sloan-Kettering 癌症中心提供。肿瘤细胞在改良的恩格培养液(10% 小牛血清,5% 链霉素)中贴壁生长。细胞培养箱控制为湿润的 37℃ 含有 5% CO₂。当贴壁细胞达到 80% ~ 90% 融合时,使用胰蛋白酶消化脱壁。利用胎盘蓝检测细胞活力,活力达到 95% 的细胞用于实验。

1.2 裸小鼠的脑内原位种植肿瘤模型

14 只 6 周的雌性无胸腺小鼠,体重 17 ~ 19 克,腹腔注射克他命麻醉液(80 mg/kg),立体定向头架固定小鼠头部。中线切口,应用磨钻于前囟前 0.5 mm,中线旁 2.5 mm 颅骨上钻孔(如图 1A)。将 25 号针连接到固定于立体定向架上的 10 μ l 微量注射器上用于注射肿瘤细胞。注射针尖进入距颅骨表面 3.2 mm 的脑内保持 2 分钟后,再回退固定于 3.0 mm 深处。1.4 μ l 含有 4×10^5 个 U87 肿瘤细胞悬液在 5 分钟内注入,留针 5 分钟后缓慢退出。用骨蜡封闭骨孔,医用胶粘合切口。上述操作均在无菌条件下完成。种植有肿瘤的裸小鼠按前述方法^[11]作活体荧光显像检查显示有肿瘤生长后

依据荧光信号强度分组用于本实验。

1.3 渗透泵强化对流释放给药系统的安置

渗透泵强化对流释放给药系统(ALZET model 1007D,美国 Durect 公司产)由微量渗透泵、流量控制器、导管和注射针组成(如图 1B)。按渗透泵系统说明填注渗透泵并连接 1.5 cm 输液导管和 3-mm 长的 25 号针。14 只只有肿瘤生长的裸小鼠按体重和荧光强度分为二组:治疗组($n = 7$)泵内注入 100 μ l(1 μ g)的 DTATEG,对照组($n = 7$)泵内注入 100 μ l(1 μ g)的无关毒素 DT。裸小鼠麻醉并固定于立体定向头架上,从原切口分开头皮,钝性分离鼠背部皮肤并将渗透泵埋入皮下,注射针从原颅骨钻孔处垂直插入颅内肿瘤中,用少许生物胶将注射针帽固定于颅骨上,用 4-0 缝线缝合皮肤并外涂少许粘胶(如图 1C)。安置前将渗透泵流速调控为 0.5 μ l/h,安置 8 天后,再次麻醉动物打开切口,取出渗透泵给药系统,粘胶关闭切口。上述操作均在无菌条件下完成。

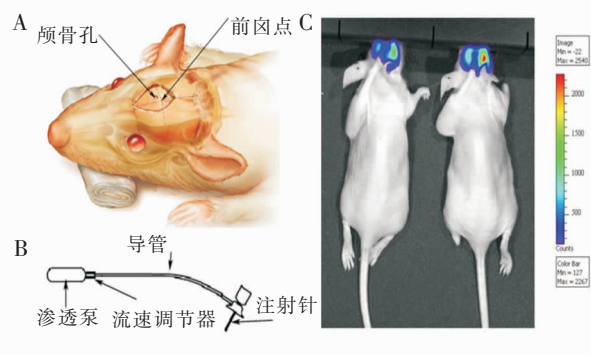


图 1 渗透泵强化对流释放给药治疗基底节区荧光素酶标记的脑恶性肿瘤的裸小鼠模型。A:肿瘤细胞和药物注入点;B:用于向肿瘤内强化对流投药的微泵系统;C:种植有脑肿瘤细胞和安装好微渗透泵进行活体荧光影像检查的裸小鼠,其头部为肿瘤显示的荧光信号,颈背部突起为安装于皮下的渗透泵,右侧彩条为荧光信号强度尺。

1.4 动物观察和病理学检查

术后分笼饲养,未使用抗生素。第一月内,每三天一次测动物体重,后每周测一次体重,当体重降低超过 20% 或有严重的症状,如行走障碍时处死动物。动物处死后,取全脑固定于 4% 的福尔马林中过夜,置入 20% 的蔗糖溶液之中,保存于 4℃ 冰箱,标本沉底后冰冻切片,7 μ m 冠状切片,HE 染色。

1.5 统计分析

应用 GraphPad 软件 4 版进行 Kaplan-Meier 生存曲线分析, $P \leq 0.05$ 有显著统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察

在实验过程中,所有的动物没有与渗透泵及外科手术相关的病残和病死发生。所有的小鼠在肿瘤细胞种植、渗透泵安置和药物投递过程及实验的早期阶段均无局灶性的神经系统症状。动物对渗透泵给药系统耐受好,无抓搔、渗透泵脱位、伤口感染及裂开等情况。实验时由于动物处于生长发育阶段,即便在肿瘤种植、药物投递后动物的体重均有增长。由于肿瘤的生长,动物缓慢出现对侧前肢的瘫痪,且在最后的 1~2 周内出现明显的恶化,其体重在临近处死前均有急骤的降低。在实验的后期阶段,常可观察到动物抽搐发作。

2.2 脑肿瘤对免疫毒素的治疗反应

1 μg 的免疫毒素 DTATEGF 或对照的 DT 通过渗透泵强化对流释放给药系统持续 8 天投递入肿瘤内。定期活体荧光检测肿瘤的生长和药物的疗效(相关数据另文报道)。Kaplan-Meier 生存曲线显示如图 2 分析显示治疗组的中位生存期较对照组明显延长,差异有显著性。(治疗组 126 天 vs. 对照组 68 天, $P = 0.0002$)。治疗组中有两只小鼠生存期超过 180 天。

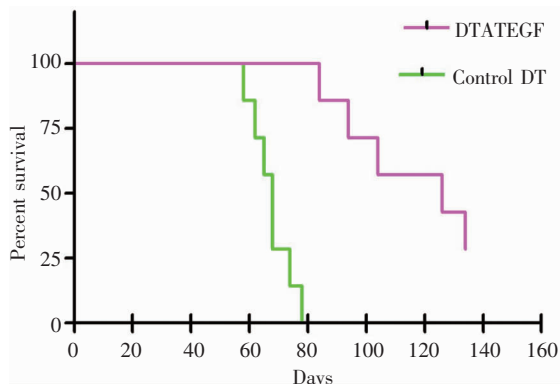


图 2 Kaplan-Meier 生在曲线显示采用 DTATEGF 治疗的荷瘤实验裸小鼠有较长的生存时间。($P = 0.0002$)

2.3 病理学检查

除治疗组两只生存期超过 180 天的小鼠,其中一只未见肿瘤生长外,其它种植 4×10^5 个 U87 肿瘤细胞的裸小鼠均检测到巨大的颅内肿瘤(如图 3A)。大体标本上可见到明显的侧脑室受压和中

线移位,两组肿瘤的大体形态学无差异。病理学检测显示多细胞病变位于脑白质内,边界不清,侵袭性生长,血管丰富,细胞有丝分裂相多见,染色体异常,并见出血和坏死,与人类胶质母细胞瘤的病理极为相似(如图 3B,C)。

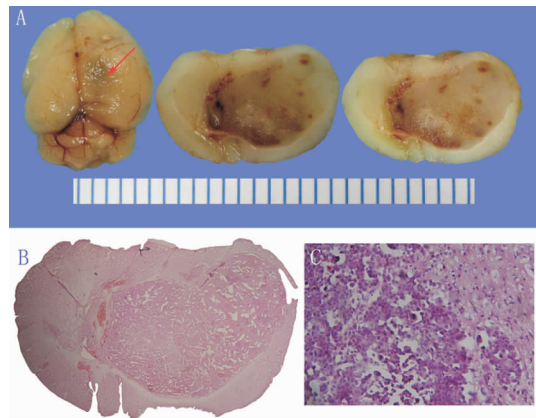


图 3 基底节区荧光素酶标记的裸小鼠脑肿瘤病理学情况。A:肿瘤大体标本检查,可见瘤内出血、坏死和粗大的新生血管;B和C:分别为 HE 染色光镜低倍和高倍情况。

3 讨论

恶性胶质瘤是一种具有高度增殖和侵袭性的肿瘤,治疗药物无法达到足以杀伤肿瘤细胞的浓度可能是这类实体肿瘤治疗失败的主要原因之一^[1-3]。CED 的方法由 Bobo 等提出,该方法将定向置入肿瘤内的导管与泵相连,通过轻度正压进行持续地微量灌注,将药物的总体流量进行分布^[3-6]。这种方法的优点是局部可获得高浓度药物又避免了全身的毒副作用。数学模型和实验模型都已证实,单纯的药物扩散方式如全身化疗或局部被动释放,包括控释药物聚合体和鞘内给药,都没有 CED 方式给药对总体流量的分布更有效^[12,13]。

大多数的研究者采用注射器或导管短期多次向瘤内 CED 给药,但由于短时间内高压力的较大容量药物的输注可引起周围组织撕裂和药物沿针道返流,从而影响药物的疗效并可因大量药物进入蛛网膜下腔出现严重的毒副作用^[6,10,14]。本研究中我们应用一种新的局部给药的设备(采用微渗透泵系统实施 CED 给药)治疗恶性脑胶质瘤,该设备是一种利用渗透压控制持续向瘤内较长时间注射药物的装置。研究结果显示本方法有下述优势:①持续保持恒定的输注压力向肿瘤组织投递药物;②连

续多日输药且免除了外接导管、注射器及多次处理动物的需要;③单位时间内输液量不多,小动物能很好的耐受;④输液泵安置于动物体内,不影响动物活动。但由于渗透泵不断从周围组织中吸收液体,有可能将泵中的高渗盐漏入皮下引起动物局部皮肤溃烂,同时在行活体荧光照像时该系统可能对荧光信号强度有影响,因此需及时拆除。此外,Oh 等研究表明中空的纤维导管能有效减少在 CED 输液中因持续的压力作用下药物流沿针道返流而增加药物疗效减少其毒副作用^[10]。本实验所用渗透泵的注药针若能采用中空的纤维导管可能取得更好的疗效。

分子靶向治疗开创了脑胶质瘤治疗的新时代,当一种新的药物体外实验证实有好的疗效后,接下来最重要的一步是证实其体内疗效。靶向毒素,亦称为免疫毒素或细胞毒素,是一种与肿瘤细胞表面特异性抗原或受体,如表皮生长因子受体、白细胞介素-13 受体等相结合的细胞分子,其毒素成份可杀死肿瘤细胞^[2]。由于其分子量较大,不易通过血脑屏障,因此如何将之有效投递入颅内是发挥其抗肿瘤作用的关键因素。我们参与研制了一种能同时靶向肿瘤细胞及其新生血管内皮细胞的表皮生长因子受体和 uPAR 的双重特异性免疫毒素(命名为 DTATEGF),体内外实验证实其对多种肿瘤具有良好的疗效^[11,15]。虽然药物疗效及其毒性研究不是本研究的重点,本实验结果表明药物 DTATEGF 能顺利通过渗透泵强化对流释放至鼠脑种植的胶质瘤内并显示有明显的疗效。我们的方法亦可用于其它药物的颅内投递,如分子靶向药物包括单克隆抗体、靶向小分子、肿瘤疫苗,为新药的临床前期研究提供了良好的实验动物模型。

参 考 文 献

- [1] Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(3):166-193.
- [2] 黄军, Li YM, Hall WA. 脑肿瘤靶向毒素治疗的现状和进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2011, 38(5):440-444.
- [3] Bruce JN, Fine BL, Canoll P, et al. Regression of Recurrent Malignant gliomas with convection-enhanced delivery of topotecan. *Neurosurgery*, 2011, 69(6):1272-1280.
- [4] Vogelbaum MA. Convection enhanced delivery for treating brain tumors and selected neurological disorders: symposium review. *J Neurooncol*, 2007, 83(1):97-109.
- [5] Hall WA. Immunotoxin therapy. *Neurosurg Clin N Am*, 1996, 7(3):537-546.
- [6] Hall WA. Convection-enhanced delivery: neurosurgical issues. *Curr Drug Targets*, 2009, 10(2):126-130.
- [7] Griffitt W, Glick RP, Lichtor T, et al. Development of a new mouse brain tumour model using implantable micro-cannulas. *J Neurooncol*, 1999, 41(2):117-120.
- [8] Saini M, Roser F, Samii M, et al. A model for intratumoural chemotherapy in the rat brain. *Acta Neurochir (Wien)*, 2004, 146(7):731-734.
- [9] Morreale VM, Herman BH, Der-Minassian V, et al. A brain-tumour model. utilizing stereotactic implantation of a permanent cannula. *J Neurosurg*, 1993, 78(6):959-965.
- [10] Oh S, Ohlfest JR, Todhunter DA, et al. Intracranial elimination of human glioblastoma brain tumors in nude rats using the bispecific ligand-directed toxin, DTEGF13 and convection enhanced delivery. *J Neurooncol*, 2009, 95(3):331-342.
- [11] Huang J, Li YM, Massague J, et al. Intracerebral infusion of the bispecific targeted toxin DTATEGF in a mouse xenograft model of a human metastatic non-small cell lung cancer. *J Neurooncol*, 2012, 109(2):229-238.
- [12] Mamot C, Nguyen JB, Pourdehnad M, et al. Extensive distribution of liposomes in rodent brains and brain tumors following convection-enhanced delivery. *J Neurooncol*, 2004, 68(1):1-9.
- [13] Morrison PF, Chen MY, Chadwick RS, et al. Focal delivery during direct infusion to brain: role of flow rate, catheter diameter, and tissue mechanics. *Am J Physiol*, 1999, 277(4 Pt 2):1218-1229.
- [14] Olson JJ, Zhang Z, Dillehay D, et al. Assessment of a balloon-tipped catheter modified for intracerebral convection-enhanced delivery. *J Neurooncol*, 2008, 89(2):159-168.
- [15] Li YM, Huang J, Mousavi S, et al. Intracranial therapy of glioblastoma with a novel bispecific ligand-directed diphtheria toxin targeting human epidermal growth factor and urokinase-type plasminogen activator receptors. The 80th AANS Annual Scientific Meeting at the Miami Beach Convention Center in Miami, Florida, April 14-18, 2012.