

· 临床研究 ·

结膜下注射卡铂和环孢素联合治疗视网膜母细胞瘤的实验研究

毛羽翔, 吴中耀, 杨华胜, 何剑峰, 林少芬, 黎 玮

(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】观察结膜下注射卡铂治疗视网膜母细胞瘤(RB)的疗效和环孢素(CsA)对卡铂治疗RB的增效作用。【方法】40只RB成瘤裸鼠分8组(G1-G8),对照组(G1)结膜下注射生理盐水,全身用药组(G2)腹腔内注射卡铂350 μ g+环孢素1.0mg, G3-G5组及G6-G8组分别结膜下注射卡铂100、200、350 μ g及卡铂100、200、350 μ g+CsA 1.0mg,每周2次共3周。每天裂隙灯观察前房肿瘤情况并照相,第6周取眼球及结膜、巩膜作病理及图像处理,计算肿瘤面积及肿瘤抑瘤率。【结果】G2、G3、G6组肿瘤生长较G1组减缓,肿瘤未能控制。G4组肿瘤生长延缓,肿瘤控制率为40%。G5及G7组肿瘤无继续增大,部分肿瘤体积减少,肿瘤控制率和治愈率为60%和20%,G8组肿瘤全部控制,肿瘤控制率和治愈率为20%和80%,肿瘤基本消失。结膜下注射部位结膜和巩膜检查未见异常。图像处理及统计学分析显示,G3、G4、G6肿瘤面积和抑瘤率与G2之间无显著性差异($P>0.05$),G5、G7、G8组肿瘤面积和抑瘤率与G2之间有显著性差异($P<0.05$)。【结论】结膜下注射卡铂能在较低剂量下抑制RB生长,加用CsA能提高卡铂治疗RB疗效。结膜下联合注射卡铂和CsA是一种安全有效的RB化疗方法。

关键词: 视网膜母细胞瘤/化学疗法; 卡铂; 环孢素A; 联合化疗; 用药方法

中图分类号: R739.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0570-05

Preclinical Study of Subconjunctival Injection of Carboplatin Combining with Cyclosporin A for Retinoblastoma Treatment

MAO Yu-xiang, WU Zhong-yao, YANG Hua-sheng, HE Jian-feng, LIN Shao-fen, LI Wei

(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To evaluate the effect of subconjunctival administration of carboplatin and the inhibitory effect of cyclosporin A combining with carboplatin for the treatment of retinoblastoma (RB). 【Methods】Forty nude mice were divided randomly into 8 groups (G1-G8) equally. In G1, normal saline (NS) was injected subconjunctivally as control. In G2, the systemic administration group, 350 μ g carboplatin combining with 1.0mg cyclosporin A (CsA) was given intraperitoneally. In G3-G5, single carboplatin was injected subconjunctival at the dosage of 100, 200, and 350 μ g, respectively. In G6-G8, 100, 200, and 350 μ g of carboplatin combining with CsA 1.0mg in each was administrated subconjunctivally. All the injections were performed twice a week and lasted for 3 weeks. The areas of the tumors and the inhibitory rates were measured and the results were analyzed statistically. 【Results】The tumors in G2, G3, and G6 were not inhibited but developed slowly compared with those in G1. The tumors in G4 increased slowly and the tumors inhibitory rate was 40%. The tumors in G5 and G7 were reduced or kept stable. The inhibitory rates and the cure rates were 60% and 20%, respectively. Tumors in G8 were reduced with a 20% inhibitory rate and an 80% curing rate. The RB tumors in anterior chamber disappeared mostly in G8.

Pathological examination showed that there were no disorders found in the injection sites of conjunctiva and sclera. The image analyzing was used to measure the tumor areas and the tumor inhibitory rates. No significant difference of the tumors areas and tumors inhibitory rates in G3, G4, G6 were found compared with those in G2 (P

收稿日期: 2005-07-01

基金项目: 广东省科技计划(重点)项目(B30104); 广东省医学科研究基金资助项目(A2004217)

作者简介: 毛羽翔(1965-), 男, 广东兴宁人, 博士, 副主任医师. E-mail: myxdoctor@21cn.com

>0.05). While in G5, G7, G8, the tumors areas decreased and the tumors inhibitory rates increased significantly compared with those in G2 ($P < 0.05$). 【Conclusions】 The data indicate that subconjunctival delivery of carboplatin have better effect on the control of RB than systemic delivery, CsA enhances the inhibition effect of carboplatin and the combination injection of carboplatin and CsA subconjunctivally may be an effective and safe way in RB treatment.

Key words: retinoblastoma/chemotherapy; carboplatin; cyclosporin A; combining chemotherapy; administrated methods

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):570-574]

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤,近年来随着RB保守治疗生存率逐渐提高,眼科学者渐趋向用保守方法治疗RB^[1]。其中化疗在RB保守治疗中占重要地位。国外文献报道RB全身化疗因周期长,药物剂量大,会导致较严重全身不良反应及可能继发恶性肿瘤生长,并可引起化疗耐药性而致疗效降低或失效^[2-3]。为提高化疗疗效和降低化疗对全身损害,本研究通过对RB裸鼠结膜下联合注射化疗药物卡铂(carboplatin)及环孢素(cyclosporin A, CsA),观察眼局部化疗对RB的疗效,评价眼结膜下注射化疗药物方法治疗RB的作用及CsA对卡铂治疗RB的增效作用,目的在于探索应用新的联合化疗给药方法,提高RB化疗疗效及减少全身副作用,最终达到控制和治愈RB的目的。

1 材料和方法

1.1 RB裸鼠模型建立

取(1.0~1.2) × 10⁷/mL SO—RB50细胞混悬液0.5~0.6 μL,在显微镜下按无菌操作规程注入5~6周龄BALB/L-nu裸鼠(体质量24~26g)前房。术后7d前房肿瘤出现并继续增长者共40只入选。

1.2 RB成瘤裸鼠分组及注药方法

40只RB成瘤裸鼠分8组,每组5只;每周注药2次,共3周。对照组(G1)结膜下注射生理盐水10 μL;全身用药组(G2)腹腔内注射卡铂(山东济南齐鲁制药厂生产)350 μg+环孢素(瑞士诺华制药有限公司生产)1.0 mg;卡铂注药组(G3-G5)分别右眼结膜下注射卡铂100、200、350 μg;卡铂+环孢素注药组(G6-G8)分别右眼结膜下注射卡铂100、200、350 μg+环孢素1.0 mg。每次注射部位相同,每天裂隙灯观察药物反应及肿瘤大小变化并照相。观察指标:前房瘤体大小及肿瘤漂浮物变化;结膜下注药后眼局部反应。观察标准:治愈,前房瘤体

缩小,实验结束瘤体明显缩小或消失;控制,瘤体静止无增大;恶化,瘤体继续增大。第6周摘取眼球及注射部位结膜、巩膜连续切片行病理检查。

1.3 图像分析

连续切片取肿瘤最大径线用KONTRON IBAS2.0全自动图像分析系统计算肿瘤最大切面面积及肿瘤抑瘤率,肿瘤抑瘤率=(G1面积-GX面积)/G1面积×100%。

1.4 统计学处理

所有数据采用SPSS10.0统计软件处理,多组肿瘤面积及肿瘤抑瘤率均数比较采用方差分析,两组间肿瘤面积及肿瘤抑瘤率均数比较采用t检验,检验水准=0.05。

2 结果

2.1 大体观察结果

G1组:成瘤后3周肿瘤占满前房,角膜形成葡萄肿及大量新生血管增生。注射部位部分结膜下纤维化增生。裸鼠逐渐消瘦衰竭,第6周体质量仅为13~14g。G2组:1只裸鼠肿瘤约占1/2前房,未见继续增大。其余瘤体增生速度较G1减缓,至第4周肿瘤侵犯整个前房。4眼见角膜前葡萄肿及新生血管增生。裸鼠消瘦衰竭情况较G1明显改善,第6周体质量为21~24g。G3、G6组肿瘤继续增大,增生速度及大小与G2组相比无明显差异。G4组2只裸鼠肿瘤注药后无继续增大,控制率为40%;3只裸鼠肿瘤增长较G1组明显减慢,至第6周肿瘤未占满前房,该3组裸鼠无明显衰竭表现,体质量约为25~27g。G5、G7组各有3只裸鼠肿瘤无继续增大,1只裸鼠肿瘤体积至第6周仅为实验开始时的1/4。肿瘤控制率和治愈率分别为60%和20%(图1A,1B)。G8组中1只裸鼠肿瘤增生静止,4只裸鼠肿瘤逐渐缩小至消失,肿瘤控制率和治愈率分别为20%和80%(图1C,1D)。

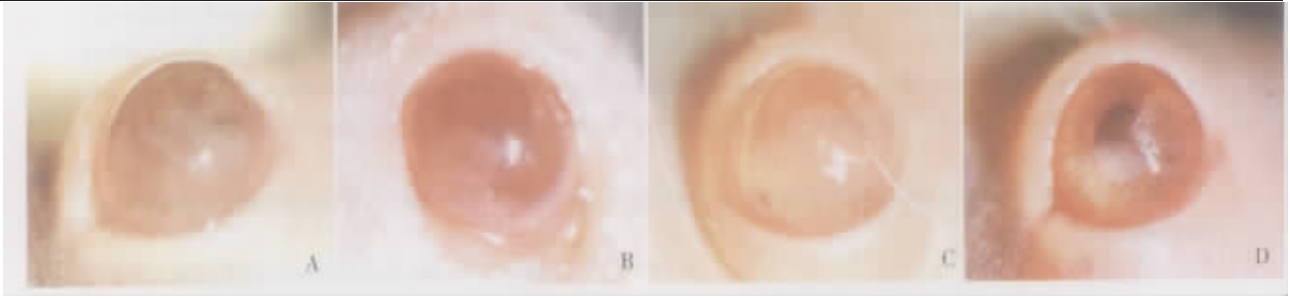


图 1 RB 裸鼠前房裂隙灯显微镜照片

Fig.1 Photograph of slit lamp microscope for nude mice anterior chamber

A,B: Before and 3 weeks after subconjunctival injection of carboplatin 200 mg + CsA 1.0 mg, the tumor reduced from filling 2/3 to 1/4 anterior chamber; C,D: Before and 3 weeks after subconjunctival injection of carboplatin 350 mg + CsA 1.0 mg, the tumor disappear completely

2.2 病理检查结果

2.2.1 G1 组 RB 细胞充满前房、玻璃体腔内及晶体前后, 细胞连接紧密, 密集成团, 有的出现典型菊花团。细胞体积均匀较大, 细胞壁完整, 细胞器及细胞核清晰, 胞浆较丰富(图 2A)。

2.2.2 G2 组 RB 细胞广泛侵犯前房及晶体前后, 但肿瘤面积少于 G1 组。玻璃体腔仅见少许肿瘤细胞。大量肿瘤坏死病灶存在, 细胞连接较松散, 细胞大小不均, 细胞壁模糊, 细胞质及细胞核浓缩, 病灶周围大量炎症细胞及肿瘤坏死细胞、碎

屑(图 2B)。

2.2.3 G5、G7 组 前房少量 RB 细胞残留, 玻璃体腔内及晶体后未见 RB 细胞。RB 细胞与炎症坏死细胞混集, 细胞大小明显不均, 细胞器及细胞核结构模糊不清。

2.2.4 G8 组 前房仅见数个 RB 细胞散在, 细胞粘连异常松散, 体积明显缩小, 胞壁模糊, 细胞器及细胞核浓缩, 结构模糊不清。晶体前后、玻璃体腔内未见 RB 细胞(图 2C)。



图 2 三组 RB 裸鼠肿瘤最大径线石蜡切片像

Fig. 2 Microscopic photograph of the biggest cross section of RB tumor of nude mice in 3 groups

A: control group, the RB tumor cells fill entire anterior chamber, anterior and posterior of lens and entire vitreous cavity; B: 3 weeks after chemotherapy, the RB cells fills most of anterior chamber and a part of vitreous cavity; C: 3 weeks after carboplatin 350 mg+CsA 1.0 mg subconjunctival injection, the RB cells in anterior and vitreous cavity disappear basically. HE $\times 40$

2.2.5 结膜和巩膜 注射后结膜充血、水肿, 2~3 d 后恢复正常。注射部位周围 2~3 个钟点结膜下纤维增生。未见结膜溃烂、坏死。注射部位巩膜与正常相比未见明显改变。病理: 结膜上皮完整, 结膜下结缔组织未见疏松改变, 部分结膜下组织增厚及纤维增生。巩膜组织结构致密, 未见疏松改变。

2.3 图像分析测量肿瘤面积与肿瘤抑瘤率计算
用药前后肿瘤面积和肿瘤抑瘤率情况见表 1。

可见随结膜下注药剂量增大, 前房肿瘤面积逐渐减少, 肿瘤抑制率依次提高; 而增加了环孢素后前房肿瘤面积减少及抑瘤率的提高较单独应用卡铂明显。统计学分析提示, 多组间肿瘤面积及肿瘤抑瘤率均数比较均有显著性差异 ($P < 0.01$), 进一步比较发现, 不同剂量卡铂情况下, 用与不用环孢素两组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。可见, 加入环孢素后肿瘤抑制效果较好。

表1 实验裸鼠肿瘤面积和抑瘤率

Table 1 The area of tumor and the inhibiting rate of RB nude mice

Group	Dosage of carboplatin(μg)	CsA(mg)	Deterioration/Control/Cure	Area of tumor(mm^2)	Inhibitory rate(%)
G1	-	-	5/0/0	0.71 \pm 0.21	0
G2	350	1.0	4/1/0	0.66 \pm 0.23	7.2 \pm 1.1
G3	100	-	5/0/0	0.67 \pm 0.19	5.4 \pm 1.4
G4	200	-	3/2/0	0.53 \pm 0.18	24.8 \pm 4.5
G5	350	-	1/3/1	0.19 \pm 0.07 ¹⁾	73.1 \pm 6.3 ¹⁾
G6	100	1.0	5/0/0	0.52 \pm 0.11	26.5 \pm 4.2
G7	200	1.0	1/3/1	0.10 \pm 0.04 ²⁾	86.1 \pm 8.4 ²⁾
G8	350	1.0	0/1/4	0.01 \pm 0.01 ³⁾	98.5 \pm 7.0 ³⁾
F				4.62	5.27
P				< 0.01	< 0.01

5 nude mice for each group. G1 injected NS as control group. G2 injected carboplatin and CsA intravenously. G3~G8 injected chemotherapy drugs subconjunctivally. LSD- t test, 1) vs. G2, P< 0.05; 2) vs. G4, P< 0.05; 3) vs. G5, P< 0.05

3 讨论

3.1 结膜下注射卡铂治疗 RB 疗效优于全身用药方法

近年来 RB 化疗疗效不断提高,但大剂量化疗会引起严重不良反应及发生肿瘤多药耐药性^[2]。以全身静脉给药方式的常规化疗因血眼屏障等因素影响药物进入眼内,静脉用药量必须是玻璃体腔注药量的 100~10 000 倍或更多方能达到同等眼内药物浓度^[4]。

眼局部用药途径有:经扁平部玻璃体腔注药;结膜下注药。已有 RB 细胞通过针刺活检和玻璃体手术创口扩散至眼外的报道^[5],因此,经扁平部玻璃体腔注药方法不宜临床应用。药物经结膜下注射可大量通透入眼,毛羽翔等^[6]检测结膜下注射药物后眼内药物浓度,发现该方法所致眼内药物浓度大大高于全身注药。因此应用结膜下注射方法是提高眼内药物浓度的有效手段。

卡铂是目前新一代化疗药物,临床证实对 RB 治疗有效^[7,8],球周注射对灵长类动物有良好耐受性,结膜下注射卡铂后眼内药物浓度明显高于全身静脉用药方法^[3,9]。实验提示结膜下注射后 2 h,血液中卡铂浓度仅为静脉给药的 2.9%^[9],对全身影响较小。Murray 等^[10]在 RB 转基因鼠结膜下注射卡铂后发现卡铂局部用药量为 180 μg 时能抑制肿瘤生长,对 RB 抑制作用呈剂量相关效应。用结膜下注射方法达到有效抑瘤作用的卡铂用量仅是全身用药的 1/10^[9]。Abramson 等^[9]和 Hayden 等^[11]也

提出了相似的观点及结论。因此卡铂是较理想的结膜下注射治疗 RB 的化疗药物。

本组实验卡铂全身用药量达 350 μg 时仍未能抑制 RB 生长。结膜下注射卡铂用量 200 μg 时已能部分抑制 RB 生长;当卡铂用量达 350 μg 时, RB 明显受抑制,肿瘤面积明显小于全身用药组。这可能与结膜下注射方法能使眼内药物浓度增加有关,但低剂量卡铂结膜下注射仍不能使眼内药物达到治疗剂量,因而只能延缓肿瘤增生而不能杀灭 RB。只有结膜下注射卡铂达到一定剂量时,方能抑制 RB 增生。但结膜下注射化疗方法与全身化疗相比,达到治疗效果所需药物用量明显减少,因而该方法对全身影响较小。本实验结膜下注射卡铂有效剂量为 350 μg ,高于国外报道的结膜下注射卡铂治疗 RB 的有效剂量 180 μg ^[10]。这可能与实验裸鼠种系、RB 成瘤细胞系的差异及裸鼠大小差异等因素有关。结膜下注射卡铂后结膜和巩膜病理检查无异常提示该方法是一种安全有效的局部化疗方式。

3.2 环孢素对卡铂抑制杀灭 RB 有促效作用

以往研究显示 RB 细胞对化疗药物易产生多药耐药性,20%~30% RB 细胞未经化疗也会对化疗药物产生耐药性作用^[12],因而部分 RB 患者进行数个化疗疗程后会出现疗效下降或无效现象^[7]。研究发现^[13,14]RB 化疗失败患者之肿瘤细胞中可发现抑制多种药物疗效的 P 黏蛋白高度表达,其通过向细胞外转运化疗药物而促使化疗药物从耐药的肿瘤细胞中外流。P 黏蛋白高度表达被认为可能是 RB 化疗疗效降低原因之一。

环孢素是 P 黏蛋白抑制剂, 能有效地阻止肿瘤组织 P 黏蛋白的表达^[2,13]。体外实验提示单独应用环孢素作用于 RB 细胞并无抑制杀灭肿瘤作用, 但联合化疗药物作用与 RB 细胞则对抑制杀灭肿瘤有促效作用^[16]。实验提示环孢素可逆转多种化疗药物的耐药作用, 并能增加化疗药物的疗效及减少 RB 的复发率^[15,16]。本实验提示低剂量卡铂 (100 μg) 加用环孢素结膜下注射对抑制 RB 生长无明显作用, 当卡铂用量达到 200 μg (远低于卡铂结膜下单独注射有效剂量 350 μg) 时加用环孢素可抑制 RB 生长, 肿瘤控制率和治愈率都达到了结膜下单独注射 350 μg 卡铂时疗效。在使用同一剂量卡铂时是否加用环孢素其肿瘤面积和肿瘤抑瘤率对比有显著性差异。因此我们认为环孢素对提高卡铂治疗 RB 疗效有一定的促效作用, 这可能是通过抑制 RB 细胞 P 黏蛋白表达起效。而用结膜下注射方式可使眼内药物较全身用药方法明显提高, 因此联合卡铂和环孢素结膜下注射可增加环孢素进入眼内药物浓度, 提高卡铂对 RB 的疗效作用。考虑到 RB 细胞对化疗药物有化疗耐药性的特性, 我们认为加用环孢素后, 卡铂抑制 RB 疗效得到提高可能是环孢素起抗耐药性作用的结果。

CsA 对卡铂治疗 RB 有一定的增效作用。结膜下联合注射卡铂和 CsA 方法能在减低化疗用药剂量的同时, 有效地抑制 RB 细胞的生长, 这一方法对指导临床上采用眼局部化疗方法和合理使用 CsA 有重要意义。

参考文献:

- [1] DEPOTTER P. Current treatment of retinoblastoma [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2002, 13(5):331- 336.
- [2] YANAGISAWA T. Systemic chemotherapy as a new conservative treatment for intraocular retinoblastoma [J]. *Int J Clin Oncol*, 2004,9(1):13- 24.
- [3] SHIELDS C L, SHIELDS J A. Recent developments in the management of retinoblastoma [J]. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 1999, 36(1):8- 18.
- [4] SHIELDS CL, DEPOTTER P, HIMMELSTEIN B, et al. Chemoreduction in the initial management of intraocular retinoblastoma [J]. *Arch Ophthalmol*, 1996,114(11): 1330- 1338.
- [5] KINGSTON J E, HUNGERFORD J L, MADREPERLA S A, et al. Results of combined chemotherapy and radiotherapy for advanced intraocular retinoblastoma[J]. *Arch Ophthalmol*, 1996,114(11):1339- 1347.
- [6] 毛羽翔, 吴中耀, 林少芬, 等. 足叶乙贰全身和眼局部用药后眼内药物浓度检测及临床意义[J]. *中国实用眼科杂志*, 2002,20(13):107- 109.
- [7] BALMER A, MUNIER F, ZOGRAFOS L. New strategies in the management of retinoblastoma[J]. *J Fr Ophthalmol*,2002 ,25(2):187- 193.
- [8] ABRAMSON D H, FRANK C M, DUNKEL I J. A phase / study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma[J]. *Ophthalmology*,1999, 106(10):1947- 1950.
- [9] MENDELSON ME, ABRAMSON DH, MADDEN T, et al. intraocular concentrations of chemotherapeutic agents after systemic or local administration [J]. *Arch Ophthalmol*, 1998,116(9):1209- 1212.
- [10] MURRAY T G, CICCARELLI N, O BRIEN J M, et al. Subconjunctival carboplatin therapy and cryotherapy in the treatment of transgenic murine retinoblastoma [J]. *Arch Ophthalmol*, 1997,115(10):1286- 1290.
- [11] HAYDEN B H, MYRRAY T G, SCOTT I U, et al. Subconjunctival carboplatin in retinoblastoma[J]. *Arch Ophthalmol* , 2000,118(11):1549- 1554.
- [12] SCHOUTEN- van- MEETEREN A Y, van- der- VALK P, van- der- LINDEN H C, et al. Histopathologic features of retinoblastoma and its relation with in vitro drug resistance measured by means of the MTT assay [J]. *Cancer*, 2001, 92(11): 2933- 2940.
- [13] CHAN H S, DEBOER G, THIESSEN J J, et al. Combining cyclosporin with chemotherapy controls intraocular retinoblastoma without requiring radiation [J]. *Clin Cancer Res*, 1996, 2(9):1499- 1508.
- [14] DAOUDAKI M, FOUZAS I, STAFF V, et al. Cyclosporine A augments P- glycoprotein expression in the regenerating rat liver[J]. *Biol Pharm Bull*,2003,26(3):303- 307.
- [15] CHAN H S, LU Y, GROGAN T M, et al. Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of P- glycoprotein[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(12): 2325- 2330.
- [16] 毛羽翔, 吴中耀, 杨华胜, 等. 环孢素影响化疗药物对视网膜母细胞瘤细胞的抑制作用[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004,25(3) : 212- 216.

(编辑 刘清海)