

槐耳清膏联合化疗栓塞对兔VX2肝癌肝功能、VEGF及MVD的影响

任建庄, 郑传胜, 冯敢生, 梁惠民, 夏向文, 赵辉, 段旭华

任建庄, 郑传胜, 冯敢生, 梁惠民, 夏向文, 赵辉, 段旭华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科 湖北省武汉市 430022

任建庄, 博士, 副主任医师, 主要从事肝癌的介入治疗研究。

作者贡献分布: 任建庄与郑传胜对此文所作贡献均等; 此课题由郑传胜, 冯敢生, 梁惠民及任建庄设计; 研究过程由任建庄, 郑传胜及夏向文完成; 数据分析由任建庄, 赵辉及段旭华完成; 论文写作由任建庄与郑传胜完成。

通讯作者: 郑传胜, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科。 hqzcsxh@sina.com

电话: 027-85726807/85726432

收稿日期: 2008-11-15 修回日期: 2009-01-11

接受日期: 2009-01-19 在线出版日期: 2009-02-18

Effect of Huaier extract combined with chemoembolization on the expression of VEGF, MVD and hepatic function of rabbit VX2 hepatocarcinoma

Jian-Zhuang Ren, Chuan-Sheng Zheng, Gan-Sheng Feng, Hui-Min Liang, Xiang-Wen Xia, Hui Zhao, Xu-Hua Duan

Jian-Zhuang Ren, Chuan-Sheng Zheng, Gan-Sheng Feng, Hui-Min Liang, Xiang-Wen Xia, Hui Zhao, Xu-Hua Duan, Department of Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Chuan-Sheng Zheng, Department of Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. hqzcsxh@sina.com

Received: 2008-11-15 Revised: 2009-01-11

Accepted: 2009-01-19 Published online: 2009-02-18

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effect of Huaier extract combined with transcatheterized arterial chemoembolization on the expression of VEGF and MVD and hepatic function of rabbit VX2 hepatocarcinoma.

METHODS: Thirty six rabbits with experimental liver cancer diagnosed by MRI were randomly divided into 3 groups. The rabbits in group A (control group) were infused with 0.2 mL/kg physiological saline via the hepatic artery, group B (TACE group) were infused with lipiodol 0.2 mL/

kg+MMC 0.5 mg/kg via the hepatic artery while group C (TACE + administration with huaier extract) were given by oral administration with 500 mg/(kg·d) Huaier extract after TACE. The levels of AST and ALT in serum were respectively tested 1 day before operation, 3 days, 7 days and 14 days after operation. Two weeks after operation, the rabbits were sacrificed and the tumors were taken out. Immunohistochemical staining was performed to detect the expression and localization of factor VIII and VEGF. The MVD was calculated by counting the factor VIII positive endothelial cells.

RESULTS: There was no significant difference of rabbits' serum AST and ALT among 3 groups 1 day before operation. However, 3 and 7 days after operation, there was significant difference of rabbits' serum AST and ALT among 3 groups ($F = 28.411, 55.537$, both $P < 0.05$; $F = 8.565, 6.401$, both $P < 0.05$), and there was significant difference between group B and group C ($P < 0.05$). The MVD and the positive express of VEGF were the lowest in group C, the highest in group B. There was significant difference among 3 groups ($F = 5.22, P < 0.05$; $\chi^2 = 7.247, P < 0.05$), and there was significant difference between group B and group C ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The Huaier extract can improve the hepatic function of rabbit VX2 hepatocarcinoma after TACE, which works on hepatocarcinoma through diminishing the expression of VEGF and inhibiting the angiogenesis of tumor.

Key Words: Huaier extract; Hepatocarcinoma; Chemoembolization; Rabbit VX2 tumor; Vascular endothelial growth factor; Microvessel density

Ren JZ, Zheng CS, Feng GS, Liang HM, Xia XW, Zhao H, Duan XH. Effect of Huaier extract combined with chemoembolization on the expression of VEGF, MVD and hepatic function of rabbit VX2 hepatocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(5): 449-453

摘要

目的: 观察槐耳清膏联合经肝动脉化疗栓塞

■背景资料

原发性肝癌发现时大部分已不能手术切除, 经导管肝动脉化疗栓塞目前已成为治疗不能手术切除肝癌的主要手段之一, 但TACE的远期疗效仍不理想, 其重要原因为TACE后患者肝功能损伤, 肿瘤新生血管形成等原因使TACE后病灶内残存的肿瘤细胞得以继续生长和转移。中医药在肝癌的治疗中发挥着不可替代的作用, 中西医结合治疗已成为肝癌治疗的一种重要手段。

■同行评议者

刘宝瑞, 教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心; 韩新巍, 教授, 河南省郑州大学第一附属医院放射科

■ 研发前沿

近年来人们用中成药槐耳颗粒冲剂作为TACE的辅助治疗,取得了明显的临床疗效,但其作用机制尚不清楚。

对兔VX2肝癌肝功能、VEGF及MVD的影响。

方法: 将36只MRI证实已成功接种VX2肝癌的荷瘤兔随机分为3组,开腹经肝动脉穿刺分别给予不同处理: A组为生理盐水对照组,经肝动脉注入0.2 mL/kg体质量生理盐水; B组为TACE组,经肝动脉注入超液态碘化油0.2 mL/kg+丝裂霉素0.5mg/kg体质量乳剂; C组为TACE+槐耳清膏灌服组, TACE方法同B组,同时术后每天灌服槐耳清膏500 mg/kg体质量。介入治疗前1 d及治疗后3、7、14 d抽血检测血清的ALT和AST。术后2 wk用免疫组织化学方法检测各组肿瘤细胞Ⅷ因子及VEGF的表达情况,对Ⅷ因子染色阳性血管内皮细胞进行MVD计数。

结果: 介入治疗前1 d, 3组动物ALT、AST水平差异无显著性; 介入治疗后3和7 d, 3组动物ALT和AST水平相比差异有统计学意义($F = 28.411, 55.537, 均P < 0.05; F = 8.565, 6.401, 均P < 0.05$), C组与B组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。3组动物MVD值和VEGF的表达强度以C组最低, B组最高, 3组相比差异有统计学意义($F = 5.22, P < 0.05; \chi^2 = 7.247, P < 0.05$), C组与B组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 槐耳清膏可以改善动物TACE术后的肝功能, 并可通过减少VEGF表达, 抑制肿瘤血管生成达到治疗肝癌的目的。

关键词: 槐耳清膏; 肝癌; 化疗栓塞; 兔VX2肿瘤; 血管内皮生长因子; 微血管密度

任建庄, 郑传胜, 冯敬生, 梁惠民, 夏向文, 赵辉, 段旭华. 槐耳清膏联合化疗栓塞对兔VX2肝癌肝功能、VEGF及MVD的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(5): 449-453
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/449.asp>

0 引言

原发性肝癌早期施行手术切除仍是目前首选的、最有效的治疗方法。但肝癌发现时大部分已不能手术切除, 经导管肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE) 目前已成为治疗不能手术切除肝癌的主要手段之一^[1], 但TACE的远期疗效仍不理想, 其重要原因为TACE后患者肝功能损伤, 肿瘤新生血管形成等原因使TACE后病灶内残存的肿瘤细胞得以继续生长和转移。为了增加TACE的疗效, 近年来人们用中成药槐耳颗粒冲剂(其有效成分为槐耳清膏)作为TACE的辅助治疗, 取得了

明显的临床疗效^[2], 但其作用机制尚不清楚。本实验通过槐耳清膏联合TACE对兔VX2肝癌肝功能、残存肿瘤组织内血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及微血管密度(microvessel density, MVD)的影响, 探讨槐耳清膏的抗癌机制。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔36只, 雌雄不限, 体质量 2300 ± 150 g, 由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。兔VX2瘤株由华中科技大学附属同济医院肝胆外科提供。槐耳清膏由江苏启东盖天力制药有限公司提供, 临用时将槐耳清膏溶于生理盐水中, 配制成100 g/L溶液备用。本实验所用的VEGF和Ⅷ因子单克隆抗体均购自武汉博士德公司; 一抗工作液浓度: VEGF和Ⅷ因子均为1:100。SupervisionTM二步法(通用型)免疫组化检测试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型分组及治疗方法: VX2肝癌模型的建立及手术方式参照文献[3]进行。把36只MRI证实的VX2肝癌模型随机分为A、B、C组, 每组12只。在DSA床上开腹, 暴露肝门区的肝动脉, 用动脉夹暂时夹闭肝右动脉, 在肝固有动脉用自制的细针穿刺, 观察到回血后手推造影, 观察肿瘤染色情况, 然后分别进行相应处理。A组为生理盐水对照组: 经肝动脉缓慢注入0.2 mL/kg体质量生理盐水; B组为单纯TACE组: 经肝动脉注入超液态碘化油0.2 mL/kg+丝裂霉素0.5 mg/kg体质量乳剂; C组为TACE+槐耳清膏灌服组: TACE方法同B组, 同时术后每天灌服槐耳清膏500 mg/kg体质量。2 wk后处死所有动物, 取出肿瘤标本用40 g/L甲醛溶液固定。

1.2.2 肝功能检查: 介入治疗前1 d及治疗后3、7和14 d分别抽血检测血清的丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)。

1.2.3 免疫组化: 采用SupervisionTM二步法, DAB/H₂O₂显色。取原固定的组织标本, 常规石蜡包埋, 制成厚度为4 μm的切片, 按试剂盒说明书的方法和步骤行VEGF及Ⅷ因子免疫组织化学染色。

1.2.4 免疫组织化学结果判定: VEGF染色阳性细胞为肿瘤细胞胞质内有棕黄色颗粒状染色, 其VEGF半定量判定标准参照Park *et al*^[4]的方法: 每张切片先在低倍镜下(40倍)全面观察, 选定VEGF表达最强处, 在400倍镜下计数3个视野的

■应用要点

本研究通过槐耳清膏联合TACE对兔VX2肝癌肝功能、残存肿瘤组织内血管内皮生长因子及微血管密度的影响,发现槐耳清膏可以改善动物TACE术后的肝功能,减少残存肿瘤组织内VEGF表达,抑制肿瘤血管生成.槐耳清膏对肝癌有治疗作用.

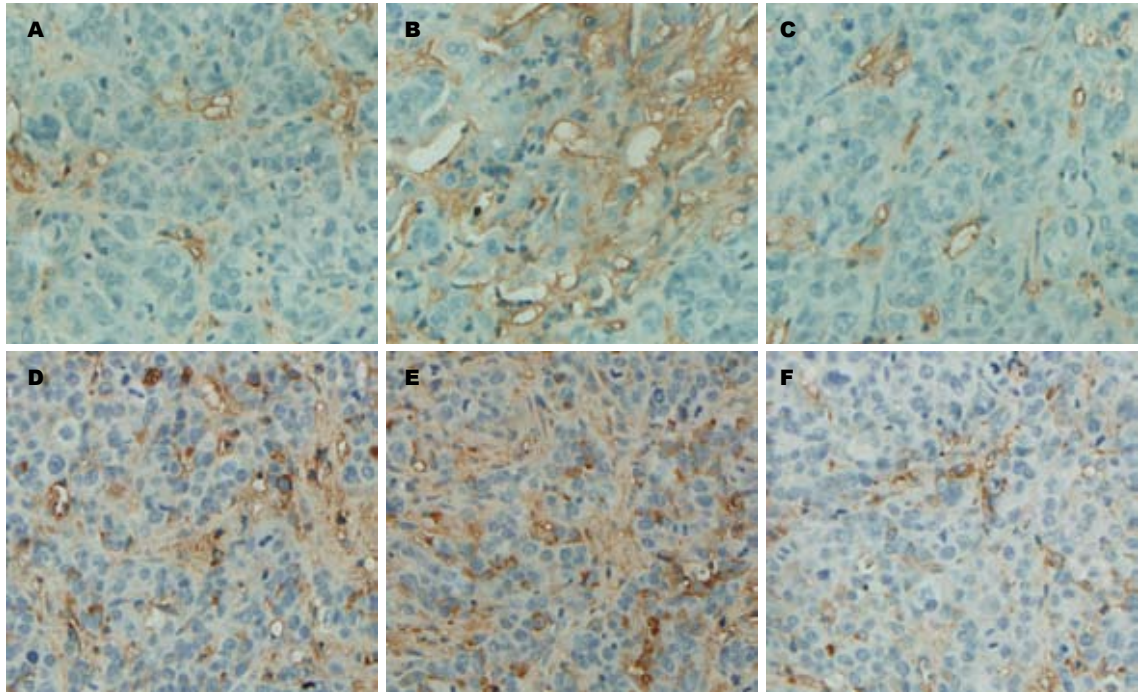


图1 TACE后的MVD值及VEGF表达的监测结果(免疫组化染色 $\times 400$). A: A组VIII因子阳性血管内皮细胞; B: B组VIII因子阳性血管内皮细胞; C: C组VIII因子阳性血管内皮细胞; D: A组VEGF阳性细胞; E: B组VEGF阳性细胞; F: C组VEGF阳性细胞.

等症状的作用,在肝癌的治疗中取得了明显疗效,是一种较理想的抗癌新药.目前通过对槐耳清膏进行研究发现其抗肿瘤机制主要为:抑制肿瘤血管内皮细胞增殖,阻碍肿瘤血管生成;诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖;防癌,抑癌作用.

肝脏是人体含酶最丰富的器官,有些酶(如ALT、AST)存在于肝细胞内,当肝细胞损伤时释放入血流,使血清内这些酶活性升高,所以,血清内这些酶的变化能反映肝脏的病理状态.在临床患者TACE术后,由于化疗药的毒副作用及栓塞损伤肝脏,患者常有肝功能异常和免疫功能下降,服用槐耳颗粒冲剂后,患者的临床症状和肝功能恢复较快,但由于临床肝癌患者的病理类型、肝硬化基础及治疗方法的个体差异等因素不同,对槐耳清膏的疗效无法得出有力的结论,只能是一些经验上的总结.本试验通过对VX2肝癌TACE后检查肝功能发现:术后3、7 d, C组肝功能(ALT和AST)恢复较快,与B组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),显示槐耳清膏可以改善TACE后的肝功能.

肿瘤有诱导血管生成的能力,肿瘤的血管生成受血管生成因子的调节.肿瘤细胞本身及炎细胞能产生血管生成因子,诱导新生血管的生成.肿瘤新生血管生成在肿瘤的进展中起着重要作用^[9].血管内皮细胞和成纤维细胞表面有

血管生成因子受体,血管生成因子与其受体结合后,可促进血管内皮细胞分裂和毛细血管出芽生长,在肿瘤新生血管生成中发挥重要的作用^[10].在众多的促血管生成因子中,对VEGF的研究最为深入,VEGF是目前发现刺激肿瘤血管生长最重要而直接的因子,在肝癌的发生、发展及预后中具有极其重要的地位.恶性肿瘤的血管生成与肿瘤的发生、恶性程度、生长转移和患者预后有密切关系,肿瘤血管生成的数量可通过测定MVD进行评估, MVD可作为量化血管生成程度的指标^[11],测量肿瘤组织中的MVD有助于判断其浸润及转移的潜能. TACE除引起肿瘤缺血、缺氧坏死外,还可上调促血管生成因子的表达^[12],导致肿瘤新生血管的生成、侧支循环的建立等使残存肿瘤继续生长.因此,抑制肿瘤血管生成也是一个重要的抗癌治疗策略.本实验结果显示: TACE后C组VEGF表达最低、MVD计数最少,与B组相比,差异有显著性($P < 0.05$),表明槐耳清膏可通过减少VEGF表达,抑制肿瘤血管生成达到抗肿瘤治疗的目的.

4 参考文献

- O'Suilleabhain CB, Poon RT, Yong JL, Ooi GC, Tso WK, Fan ST. Factors predictive of 5-year survival after transarterial chemoembolization for inoperable hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2003; 90: 325-331
- 郭添胜, 黄福喜, 曹小龙. 槐耳颗粒联合介入治疗

- 原发性肝癌的疗效观察. 实用医学杂志 2005; 16: 1846-1848
- 3 周承凯, 梁惠民, 李欣, 柳曦. 实验兔VX2肝肿瘤模型制作及动脉插管技术探讨. 介入放射学杂志 2006; 15: 101-104
- 4 Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1061-1065
- 5 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8
- 6 方建林, 郑传胜, 冯敢生, 陶红芳, 王勇, 任建庄. 全反式维甲酸对Walker-256肝癌细胞分化及凋亡的诱导作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2929-2934
- 7 骆丹, 叶丽红. 中药治疗肝癌在实验研究领域的发展现状及趋势. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2964-2968
- 8 李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 李富玉, 李军艳, 许彦来, 陈美南. 益气活血软坚解毒方含药血清诱导人肝癌细胞系Bel-7402细胞凋亡过程中部分凋亡调控基因变化. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3443-3449
- 9 Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438: 967-974
- 10 Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248
- 11 Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer* 2002; 86: 1566-1577
- 12 Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther* 2005; 4: 315-321

■同行评价

本文通过观察槐耳清膏联合经肝动脉化疗栓塞对兔VX2肝癌肝功能、VEGF及MVD的影响, 研究了中药槐耳清膏对动物TACE术后的肝功能改善作用. 文章设计思路清晰, 结果客观, 具有较好的学术价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.(常务副总编辑: 张海宁 2009-02-18)