

· 短篇论著 ·

槐耳清膏联合氟尿嘧啶抑制肝癌生长转移的实验研究

张巨波 孙惠川 薛琼 钱永兵 英卫东 高东梅 潘奇 孙冰生 陈军 汤钊猷

槐耳清膏的主要活性成分是多糖蛋白^[1](polysaccharide of *trametes robbiniophila murr*, PS-T),能诱导人直肠癌细胞株(HR8348 细胞)发生凋亡^[2],对血管内皮细胞体外构建新生血管有抑制作用^[3]。但槐耳清膏对肝癌在体内的生长和转移的干预作用尚无报道。本研究利用裸鼠人肝癌转移模型 LCI-D20^[4]进行了抑制肿瘤生长和转移的动物实验,现报道如下。

材料与方法

1. 实验动物模型的建立:4~6 周龄 BALB/c nu/nu 雄性裸鼠(中国科学院上海药物所实验动物部)在本所裸鼠室无特定病原体环境下饲养。裸鼠人肝癌原位种植模型和原位接种肝癌切除后复发模型的建立:取本所建立的高转移潜能人肝癌模型 LCI-D20 瘤原,浸入生理盐水,剪切成 2 mm×1 mm×1 mm 大小备用。以 2.5 mg/kg 戊巴比妥腹腔注射麻酔裸鼠,手术野消毒,左肋缘下斜切口约 8 mm 进腹,将肝叶从切口取出,斜形切开肝表面,植入组织块,6-0 线缝合肝切缘和皮肤。

2. 干预原发肿瘤生长实验:肿瘤接种后次日开始用药,共分为 5 组,每组 8 只。分别为 A 组:0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹槐耳清膏灌胃;B 组:4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹槐耳清膏灌胃;C 组:10 mg·kg⁻¹·d⁻¹氟尿嘧啶(5-Fu)腹腔注射,连续给药 5 d 后停药 2 d;D 组:0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹槐耳清膏灌胃联合 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹5-Fu 腹腔注射;E 组:注射等体积生理盐水。治疗在模型制作后第 2 天开始,持续 35 d。

3. 观察指标:观察各组裸鼠的进食及一般状况,每 7 d 称量体重 1 次。治疗 35 d 后处死动物。取血,待其凝固后 4℃ 下离心(1000 r/min)分离血清,-80℃ 冰箱储存备用。检查腹腔、肝脏和肺转移情况,测量肿瘤的重量、最大直径(A)、最小直径(B)。肿瘤体积(V)=AB²/2。取肿瘤中非坏死组织-80℃ 冰箱储存备用。将肺常规固定后,连续切取 35 张切片做组织学检查。

4. 凋亡细胞的生化检测:采用 TUNEL 法试剂盒(美国 Roche 公司),操作方法严格按照试剂说明书进行。

5. 肿瘤微血管密度(MVD)测定:取-80℃ 冰箱储存备用的肿瘤组织做冰冻切片(10 μm),将切片贴附于涂有 APES 胶的玻璃片上。用冷丙酮固定 15 min 后以 10% 山羊血清封闭。滴加大鼠抗小鼠 CD31 抗体(美国 BD 公司),4℃

孵育 18 h,正常大鼠 IgG 代替一抗作为阴性对照,加 Tritc 标记山羊抗大鼠二抗(美国 ZyMed Laboratories 公司),37℃ 孵育 30 min,ABC 法染色,DAB 显色,显微镜下观察。根据 Weidner 方法^[5]计算 MVD。

6. 血清血管内皮细胞生长因子(VEGF)检测:按 ELISA 试剂盒(美国 RD Systems 公司)说明书进行操作。用酶标仪(3550 UV 型,美国 Bio-Rad 公司)450/540 nm 双波长检测各样品的吸光度(A 值)。根据标准品浓度得出标准曲线和换算公式,最后计算出待测样品的浓度。每块 96 孔板留出 8 孔作为板间对照和板内对照。

7. 血液生化指标:肝、肾功能血生化指标采用全自动生化分析仪检测(日本东芝公司),采用放射免疫分析法检测甲胎蛋白(AFP)含量。

8. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 统计软件,多样本均数比较用 One-Way ANOVA 检验,频数变量之间比较用 χ^2 检验。

结 果

1. 裸鼠一般情况以及血清学检测结果:整个实验过程中未观察到各种治疗药物对裸鼠产生明显影响。C、D 两组的裸鼠有轻度腹泻,体重低于 E 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组裸鼠主要血清学检测指标中,B 组[(65 ± 47) ng/ml] 的 AFP 较 E 组[(390 ± 188) ng/ml] 降低($P < 0.05$),其余各组差异均无统计学意义。

2. 槐耳清膏对原发肿瘤生长、转移的抑制作用:治疗结束时 E 组可见肝内原位瘤平均重量为 2.0 g,体积为 1173 mm³,A、C 两组的肿瘤重量和体积与 E 组比较差别无统计学意义($P > 0.05$),而 B、D 两组的肿瘤重量与体积均小于 E 组($P < 0.05$),抑瘤率分别为 60% 和 55%;A、C 两组的肺转移率与 E 组比较差别无统计学意义($P > 0.05$),B、D 两组的肺转移率与 E 组相比显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

3. 槐耳清膏对肿瘤细胞诱导血管生成的抑制作用:在所有的肝癌组织中 CD31 抗体染色均可显示肿瘤血管。微血管表现形态不一,呈星状、裂隙状或分支状。计数结果表明,B、D 两组的 MVD 明显低于 E 组($P < 0.01$),A、C 两组与 E 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1,图 1)。

4. 槐耳清膏对荷肝癌裸鼠血清 VEGF 浓度的影响:ELISA 结果表明,B、D 两组血清 VEGF 浓度明显低于 E 组($P < 0.05$),A、C 两组血清 VEGF 浓度与 E 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 1,2)。

表 1 槐耳清膏和氟尿嘧啶对转移性人肝癌裸鼠模型生长抑制作用

组别	槐耳清膏 (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	氟尿嘧啶 (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	肿瘤重量 (g, $\bar{x} \pm s$)	肿瘤体积 (mm ³ , $\bar{x} \pm s$)	例数	肺转移 数目	微血管密度 (/HP)
A	0.5	0	1.4 ± 0.7	798 ± 156	5	3.5 ± 1.1	38 ± 7
B	4.5	0	0.8 ± 0.4 ^b	404 ± 115 ^a	1	1 ^b	21 ± 7 ^b
C	0	10	1.6 ± 0.3	896 ± 134	6	2.9 ± 1.8	35 ± 12
D	0.5	10	0.9 ± 0.6 ^a	545 ± 124 ^a	1	1 ^b	17 ± 5 ^b
E	0	0	2.0 ± 0.4	1173 ± 148	8	4.1 ± 1.5	48 ± 11

注:与 E 组相比,^aP < 0.05,^bP < 0.01

5. 槐耳清膏对肿瘤细胞和血管内皮细胞的凋亡诱导作用:为确认槐耳清膏是否具有促进肝癌血管内皮细胞凋亡的作用,我们对肿瘤组织切片进行了 CD31/TUNEL 双标记,用以定位凋亡的血管内皮细胞。结果发现,在 A 组和 B 组中,既可见较多的血管以外的凋亡细胞,还可见凋亡的内皮细胞明显增加。C 组未见明显凋亡的内皮细胞。

讨 论

本研究表明,以 LCI-D20 人肝癌裸鼠原位移植自发性多向转移模型为实验对象,应用槐耳清膏可抑制肿瘤生长以及局部和肺转移,并与剂量相关;而与传统化疗药物 5-Fu 联用,效果更为明显。

5-Fu 是临床常用的一线抗肿瘤药物,但随着剂量增加其副作用明显,从而制约了其疗效的发挥。目前多种药物联合应用,通过不同机制抑制肿瘤的生长和转移日益受到关注。Huang 等^[6]和 Clarke 等^[7]分别报道干扰素联用多烯紫杉醇、retinoid 在治疗前列腺癌和乳腺癌时可产生协同效应。我们采用较低的 5-Fu 剂量,单用并未对裸鼠产生明显影响

(出现轻度腹泻,均能自行缓解),但也不能明显抑制肿瘤生长。当 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 槐耳清膏灌胃和 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 5-Fu 腹腔注射联合应用时,两者的抗瘤抗转移作用产生协同效应,与 E 组相比肿瘤大小、MVD、血清 VEGF 浓度以及肺转移率均降低,差异有统计学意义(P < 0.05);与 C 组相比各项指标均降低,差异有统计学意义(P < 0.05)。

裸鼠血清学检测发现 A 组的 AFP 较 E 组降低,与庄毅^[1]的报道一致。对其他主要血清学指标未产生明显影响。有些临床研究表明,槐耳颗粒与常用化疗药物联合应用能提高大肠癌术后患者的免疫功能,减轻化疗毒性,改善造血功能^[8]。这些结果表明,与槐耳清膏联用,荷肝癌裸鼠对 5-Fu 副作用的耐受性得到提高,可加大 5-Fu 应用剂量,进一步提高对肝癌生长转移的抑制效果。

我们对槐耳清膏疗效的可能机制进行了初步探讨。通过抗 CD31/Tunel 双标记方法可同时检测 MVD 以及细胞的凋亡情况,结果表明槐耳清膏在促进肿瘤细胞凋亡的同时^[9],还能促进肿瘤血管内皮细胞的凋亡;而 5-Fu 通过在体内转化为氟尿嘧啶核苷酸导致 DNA 合成受阻,并能掺入

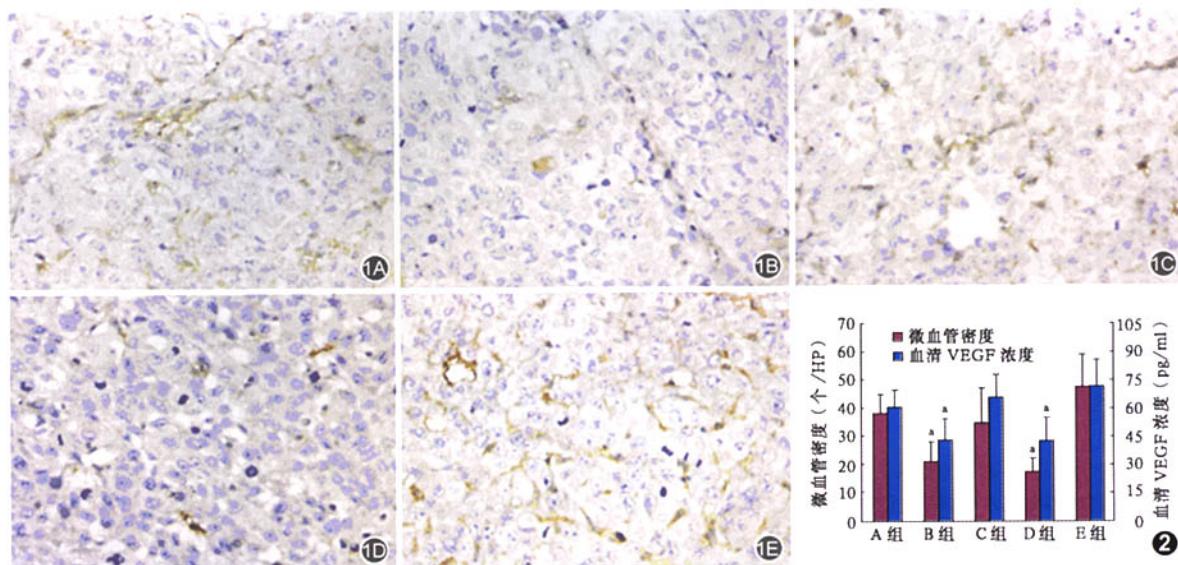
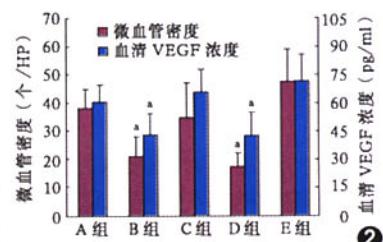


图 1 各组肝脏微血管分布情况(荧光显微镜 $\times 200$):0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 槐耳清膏治疗组(1A), 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 槐耳清膏治疗组(1B), 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 氟尿嘧啶治疗组(1C), 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 槐耳清膏灌胃联合 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 氟尿嘧啶治疗组(1D) 和对照组(1E)

图 2 各组肝脏微血管密度和血清血管内皮生长因子(VEGF)浓度比较:^aP < 0.05



RNA 干扰蛋白质合成^[10],两者通过不同的靶点发挥增效作用。Holmgren 等^[11]和 O'Reilly 等^[12]研究表明抑制肿瘤新生血管的药物血管生成抑制素通过促进内皮细胞的凋亡而延长肿瘤的生长静止期,达到阻断其生长转移的目的。槐耳清膏作用血管内皮细胞的靶点尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 庄毅.抗癌新药槐耳冲剂的研究.中国药学杂志,1998,33:273-275.
- [2] 程若川,汤礼贵,兰丽琴,等.槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡的实验研究.中国普外基础与临床杂志,2003,6:568-571.
- [3] 许戈良,英卫东,马金良,等.槐耳清膏体外抑制血管生成的实验研究.中国药理学通报,2003,19:1410-1412.
- [4] Sun FX, Tang ZY, Lui KD, et al. Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice via orthotopic implantation of histologically intact tissues. Int J Cancer, 1996, 66:239-243.
- [5] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med, 1991, 324: 1-8.
- [6] Huang SF, Kim SJ, Lee AT, et al. Inhibition of growth and metastasis of orthotopic human prostate cancer in athymic mice by combination therapy with pegylated interferon- α -2b and docetaxel. Cancer Res, 2002, 62: 5720-5726.
- [7] Clarke N, Jimenez-Linan AM, Voltz E, et al. Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon antineoplastic signaling to death ligand TRAIL. EMBO J, 2004, 23: 3051-3060.
- [8] 袁明,黄桂林,李志刚,等.槐耳颗粒配合化疗对大肠癌患者术后免疫功能的影响.中国肿瘤,2005,14:487-488.
- [9] 李立新,叶胜龙,王艳红,等.槐耳清膏诱导肝癌细胞凋亡的实验研究.中国临床医学,2005,12:1152-1153.
- [10] 孙燕,周际昌.抗肿瘤药物//陈新谦,金有豫.新编药物学.14 版.北京:人民卫生出版社,1997:513.
- [11] Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases—balance proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med, 1995, 1: 149-153.
- [12] O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, et al. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nat Med, 1996, 2: 689-692.

(收稿日期:2006-08-22)

(本文编辑:李静)