

槐耳清膏联合化疗栓塞治疗兔 VX2肝癌的实验研究

任建庄, 郑传胜*, 冯敢生, 梁惠民, 夏向文, 段旭华, 赵 辉

【摘要】 目的 观察槐耳清膏联合经肝动脉化疗栓塞(TACE)对兔 VX2肝癌生长及转移的影响。材料与方法 将 VX2瘤粒直接种植于新西兰大白兔左肝内 2周,MR证实已成功接种 VX2的荷瘤兔随机分为 3组,每组 12只,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体重生理盐水;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 0.5 mg/kg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,每天观察动物生长情况,术后 2周处死动物,测量动物体重、肿瘤体积、坏死区面积,计算肿瘤生长率、坏死率;观察肝、肺及腹腔淋巴结转移情况。结果 术前 1天 3组动物体重、肿瘤体积差异无统计学意义($P>0.05$)。术后 2周,B组动物体重下降明显,与 A组、C组相比差异均有统计学意义($P<0.05$);A组与 C组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后 2周肿瘤体积、肿瘤生长率和肿瘤坏死率 B组、C组与 A组相比差异均具有统计学意义($P<0.01$),B组与 C组相比差异亦具有统计学意义($P<0.05$)。肝和肺的转移:B组与 A组相比差异无统计学意义($P>0.05$),C组与 B组、A组相比差异均具有统计学意义($P<0.05$);腹腔淋巴结转移 3组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 槐耳清膏可以改善动物 TACE术后的生存质量;抑制肿瘤生长,促进肿瘤坏死;抑制肿瘤转移。

【关键词】 槐耳清膏 肝癌 化疗栓塞 兔,VX2肿瘤 实验研究

Empirical Study of Chemoembolization Combined with Extract of Fungi of Huaier on Hepatic Tumor of Rabbit VX2

REN Jianzhuang, ZHENG Chuansheng, FENG Gansheng, et al.

Department of Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province 430022, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effect of transcatheter arterial chemoembolization combined with extract of fungi of huaier on the growth and metastasis of hepatic tumor of rabbit VX2. **Materials and Methods** VX2 tumor pieces were surgically implanted into the left liver lobe of New Zealand white rabbits. Two weeks later, 36 rabbits with experimental hepatic tumors diagnosed by MRI were randomly divided into 3 groups with 12 rabbits in each group. The rabbits in Group A (control group) were infused with 0.2 ml/kg physiological saline via the hepatic artery. In Group B (TACE group), the rabbits were infused with lipiodol 0.2 ml/kg + MMC 0.5 mg/kg via the hepatic artery. In Group C (TACE + administration with extract of fungi of huaier), the rabbits were given oral administration with extract of fungi of huaier 500 mg/kg d after TACE. The common conditions of the rabbits were observed daily after operation. Two weeks after treatment, all the experimental rabbits were sacrificed and the volume and necrotic area of the implanted tumor were measured. The metastases in the liver, lungs and celiac lymph node were recorded. **Results** There were no significant difference in tumors' weight and volume among 3 groups at 1 day before operation ($P>0.05$). The average rabbits' weight in group B was significant lower than those in group A and Group C at 14 days after operation ($P<0.05$), but there was no significant difference between group A and group C ($P>0.05$). Two weeks after treatment, the average volume, the necrotic rate and growth rate of the implanted tumor were significantly different in three groups ($P<0.01$). The metastases rate in the livers and lungs was not significant difference between group A and group B ($P>0.05$), while there was significant difference in group A and C ($P<0.05$), and in group B and C ($P<0.05$). There was no statistical difference of metastases in celiac lymph node among group A, B and C ($P>0.05$). **Conclusion** The extract of fungi of huaier can improve the rabbits' quality of life after TACE. It can not only inhibit the growth and necrosis of tumor, but also prevent the tumor from develop-

作者单位: 430022 武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科; *通讯作者

ping metastasis to the livers and lungs

【Key words】 Extract of fungi of huaier Hepatocarcinoma Chemoembolization Rabbit, VX2 tumor Experimental study

经导管肝动脉化疗栓塞 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE) 目前已成为治疗中晚期肝癌的主要手段之一,但其远期疗效仍不理想,主要原因为 TACE 虽能使肿瘤病灶大部分发生凝固性坏死,但发生完全性坏死者少见,多数病灶内仍可残存肿瘤细胞,成为肿瘤复发及转移的根源,严重影响了 TACE 的远期疗效^[1,2]。为了增加 TACE 的疗效,近年来人们用中成药槐耳颗粒冲剂(有效成分为槐耳清膏)作为 TACE 的辅助治疗,取得了明显临床疗效^[3]。本研究主要观察槐耳清膏联合 TACE 对兔 VX2 肝癌生长及转移的影响,探讨槐耳清膏在肝癌介入治疗中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料和设备

新西兰大白兔 36 只,雌雄不限,体重(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。仪器: Siemens Angiostar 1250 MA 数字减影血管造影机; 1.5 T Siemens Magnetom AVANTO 型 MRI; 16 排 Siemens Somatom 型 CT。肝动脉穿刺针为自制:以 30 G 诺和灵针头与普通输液用的头皮针连接,即制备成 30 G 肝动脉穿刺针。槐耳清膏(批准文号:国药准字 Z20000109)由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 mg/ml 溶液备用。

1.2 VX2 肝癌模型的建立

将冰冻 VX2 瘤株按常规细胞培养法复苏后,制成细胞悬液,取 0.5 ml (约 5 × 10⁶ 个细胞)接种于兔后腿外侧肌肉内,2 周后可在接种部位扪及一直径约 2 cm 的实质性肿块,即成荷瘤种兔。无菌条件下将包块完整取下,取肿瘤边缘生长旺盛的鱼肉样组织,用剪刀剪成 1 ~ 2 mm³ 大小的瘤块,放入生理盐水中备用。明胶海绵剪成小块备用。兔禁食水 12 h,给予速眠新 0.2 ~ 0.3 ml/kg 体重肌肉麻醉后,仰卧固定于木板上,沿剑突下腹部正中开腹,将肝左叶小心拉出体外,在肝左叶肝实质较厚实部位用眼科镊刺破肝组织形成一“烧瓶”样窦道将瘤块置入,用明胶海绵封闭创口后再轻压创口约 1 min 止血并防止瘤块脱出。回纳肝脏,逐层关腹。术后 2 周 MRI

检查发现肝内肿瘤, VX2 肝癌模型建成,并在 MRI 显示的最大层面测量肿瘤的最大径及最小径。

1.3 实验动物模型分组及治疗方法

术后 2 周 MRI 证实的 36 只 VX2 肝癌模型随机分为 A、B、C 组,每组 12 只。瘤兔准备同前,在血管造影床上再次腹正中切口开腹,暴露肝门区的肝动脉,用动脉夹暂时夹闭肝右动脉,用自制的细针直接穿刺肝固有动脉,观察到回血后小心用动脉夹将细针前端与肝动脉固定,手推对比剂动脉造影,观察肿瘤染色情况,然后进行相应治疗处理。A 组为生理盐水对照组:经肝动脉缓慢注入 0.2 ml/kg 体重生理盐水,术后每天灌服生理盐水 5 ml/kg; B 组为单纯 TACE 组:超液态碘化油 0.2 ml/kg + 丝裂霉素 0.5 mg/kg 反复乳化后,透视下经连接管缓慢注入,术中观察碘油沉积情况,术后每天灌服生理盐水 5 ml/kg; 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。2 周后处死所有动物,取出肿瘤、肝、肺等标本观察。

1.4 观察指标及方法

术后每天观察动物的活动、进食、有无腹泻等一般生活状况,14 天处死前记录体重。评估肿瘤的生长情况:将取出的肿瘤标本用 10% 甲醛固定后,沿肿瘤最大层面切开,测量肿瘤的最大径及最小径,肉眼及镜下观察肿瘤的坏死情况及周围残余的肿瘤组织。肿瘤的体积 (V) = 1/2ab² (其中 a 为最大径, b 为最小径); 肿瘤坏死率 = 坏死区面积 (cm²) / 肿瘤面积 (cm²) × 100%; 肿瘤生长率 (growth rate, GR) = V_{治疗后} / V_{治疗前} × 100%。观察转移的发生率:处死动物后,先大体表面观察腹腔淋巴结、肝、肺转移情况,对不能确定转移的肝、肺、腹腔淋巴结标本固定后 3 mm 薄层切开观察,必要时随机取 10 张病理切片 200 倍光镜下观察,若镜下仍未见转移为无转移,否则为转移。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件。对 3 组动物体重、肿瘤体积、肿瘤坏死率及肿瘤生长率采用方差分析,再用 LSD 法进行组间两两比较;对肿瘤的肝、肺及腹腔淋巴结转移组间比较采用 ² 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物的一般情况

移植瘤植入前 3组动物体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$),移植瘤植入肝脏动物苏醒后,当天活动和进食量有所减少,第 2天即恢复到术前状态,到 2周 MR I检查时,除体重有所减轻外(3组动物体重差异无统计学意义, $P > 0.05$),其他一般情况无明显变化。对 3组动物介入处理后,动物的异常表现为活动减少,食欲下降,毛色缺少光泽,神情淡漠,少数呈嗜睡状态,腹泻等,以 B组表现最明显, A组与 C组表现较轻, A组与 C组术后 3~4天、B组术后 6~7天恢复到治疗前状态。到处死动物前, B组动物体重下降明显,与 A、C组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); A、C二组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 实验兔干预前后体重变化 (kg) ($\bar{x} \pm s$)

分组	移植瘤植入前	移植瘤植入后 2周	移植瘤植入后 4周
A组	2.30 ± 0.13	2.23 ± 0.16	2.07 ± 0.19
B组	2.27 ± 0.16	2.25 ± 0.15	1.80 ± 0.21
C组	2.31 ± 0.14	2.21 ± 0.16	2.12 ± 0.20
F值	0.238	0.183	8.617
P值	0.790	0.834	0.001

注: A组与 B组、A组与 C组、B组与 C组两两比较:移植瘤植入前的 P值分别为 0.646、0.834、0.505;移植瘤植入后 2周的 P值分别为 0.732、0.799、0.551;移植瘤植入后 4周的 P值分别为 0.003、0.560、0.001

2.2 影像学表现

MR I检查全部 36只荷瘤兔肝左叶均可见一个肿瘤病灶,瘤灶主体呈长 T_1 、稍长 T_2 信号,其间混杂长 T_1 、长 T_2 信号(坏死囊变区)和短 T_1 、长 T_2 信号(瘤内出血)(图 1、2)。肝动脉造影见粗大的供瘤动脉,肿瘤血管丰富,局部血管网增多、紊乱,实质期可见不规则团片状染色,主要为瘤周染色(图 3)。缓慢注入栓塞剂后,见栓塞剂呈“蝌蚪”状向瘤区聚集(图 4)、沉积(图 5)。术后 CT检查见肿瘤区碘油沉积良好(图 6)。

2.3 移植瘤的生长情况

介入治疗前 3组动物肿瘤体积差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。术后 14天, B组、C组与 A组相比显示出明显疗效,且以 C组明显, C组肿瘤体积、肿瘤生长率最小,肿瘤坏死率最大(图 7)。术后肿瘤体积、肿瘤生长率、肿瘤坏死率 3组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); B组与 C组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

2.4 肿瘤转移情况

介入治疗术后 2周处死动物通过大体解剖和病理切片观察发现:肝和肺的转移灶多在表面,呈多发圆形结节状,形态较规则(图 8);腹腔淋巴结转移呈多个大小不等的葡萄串样。3组动物已发生了转移的转移灶的数目、密集程度以 C组最少, A组和 B组较多。肝和肺的转移例数和转移率 C组最少, B

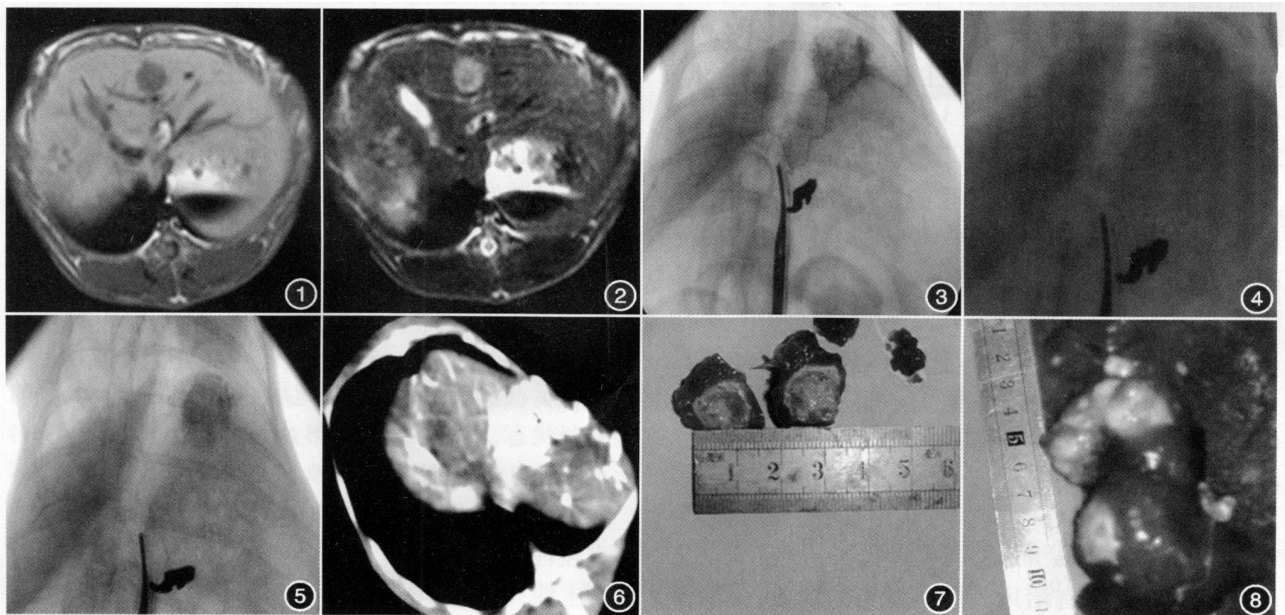


图 1、2 MR I示瘤灶主体呈长 T_1 、稍长 T_2 信号 图 3~6 为同一瘤兔。图 3 肝动脉造影见粗大的供瘤动脉,肿瘤血管丰富,可见不规则团片状染色,主要为瘤周染色;图 4 栓塞剂呈“蝌蚪”状向瘤区聚集;图 5 栓塞剂在瘤区沉积;图 6 CT示肿瘤区碘油沉积 图 7 TACE+槐耳清膏灌服后肿瘤大部分坏死 图 8 肝内转移

表 2 兔肝移植瘤介入治疗前后肿瘤大小、肿瘤坏死率及肿瘤生长率 ($\bar{x} \pm s$)

分组	肿瘤大小 (cm ³)		肿瘤生长率 (%)	肿瘤坏死率 (%)
	术前 1天	术后 14天		
A组	0.888 ±0.129	4.906 ±0.563	556.02 ±41.64	35.11 ±7.98
B组	0.875 ±0.136	1.586 ±0.572	177.47 ±43.53	56.67 ±14.61
C组	0.863 ±0.134	1.028 ±0.524	114.97 ±40.59	68.50 ±13.07
F值	0.102	172.237	388.599	23.028
P值	0.903	0.000	0.000	0.000

注:A组与B组、A组与C组、B组与C组两两比较:术前1天肿瘤大小的P值分别为0.817、0.654、0.828;术后14天肿瘤大小的P值分别为0.000、0.000、0.019;肿瘤生长率的P值分别为0.000、0.000、0.001;肿瘤坏死率的P值分别为0.000、0.000、0.024

表 3 实验动物肿瘤转移情况 (例)

分组	动物数	肝		肺		腹腔淋巴结	
		转移只数	转移率 (%)	转移只数	转移率 (%)	转移只数	转移率 (%)
A组	12	9	75.00	8	66.67	6	50.00
B组	12	11	91.67	9	75.00	8	66.67
C组	12	4	33.33	3	25.00	4	33.33

注:A组与B组、A组与C组、B组与C组两两比较:肝转移的 χ^2 值分别为1.2、4.196、8.711,P值分别为0.590、0.041、0.009;肺转移的 χ^2 值分别为0.202、4.196、6.0,P值分别为1.0、0.041、0.014;腹腔淋巴结转移的 χ^2 值分别为0.686、0.686、2.667,P值分别为0.408、0.408、0.102

组最多,B组与A组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),C组与B组、A组相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$);腹腔淋巴结转移3组相比差异无统计学意义($P > 0.05$) (表3)。

3 讨论

原发性肝癌是指自肝细胞或肝内胆管细胞发生的癌,为我国常见的恶性肿瘤之一,我国每年约有11万人死于肝癌,占全球肝癌死亡人数的45%^[4]。虽然TACE可以提高患者的生存时间和生活质量,但总体疗效并不乐观,其3年生存率只有14%~30%,其主要原因为TACE后肿瘤细胞残存和患者免疫功能低下。因此,如何控制残存肿瘤细胞,增强患者免疫功能,减少、延缓肿瘤复发和转移已成为提高TACE术后疗效的重要方向。祖国医学中草药具有这方面的独到优势:中药治疗采用辨证施治,攻补兼施的方法,治则为活血化瘀、软坚散结、清热解毒等;中药与化疗合用时,以扶正、健脾、滋阴为主,可改善症状,调动机体免疫功能,减少副反应,从而提高疗效。

槐耳是我国民间重要的药用真菌,其学名为Trametes robiniphila Murr. 中药名为槐栓菌。它味苦辛,性平无毒,有治风、破血、益力的功效,民间多用于治疗癌症及炎症。槐耳清膏是槐耳菌质经热水提取,其主要成分为多糖蛋白,现已证实多糖蛋白是槐耳菌质抗癌和增加免疫功能的主要有效成分,它

由六种单糖(含量为41.53%)和18种氨基酸(含量为12.93%)组成。目前已有以槐耳菌质为主药加工而成的槐耳颗粒冲剂(国家一类新药)用于临床,其具有益气养阴、扶正祛邪、增强免疫力的功效,且具有协同化疗、减轻化疗患者的毒副作用,改善全身症状,提高生存质量,使用安全、方便等优点,在肿瘤的治疗中取得了明显疗效,是一种较理想的抗癌新药。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^[5];诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖^[6];防癌,抑癌作用^[7]等许多方面。

在临床患者TACE术后,由于化疗药的毒副作用及栓塞后综合征,患者常有疼痛、发热、恶心、呕吐、麻痹性肠梗阻、肝功能损伤、白细胞计数降低、食欲下降等毒副反应,患者免疫功能降低,体重常在短期内下降。临床服用槐耳颗粒冲剂后,患者睡眠改善、精神好转、食欲增加、体重增加、生存质量提高。但由于临床肝癌患者的病理类型、肝硬化基础、治疗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移植性肝癌进行干预研究,发现移植瘤肝动脉造影可见粗大的供血动脉,肿瘤血管丰富,实质期可见不规则团片状染色,注入栓塞剂后,见栓塞剂向瘤区聚集,术后CT检查见肿瘤区碘油沉积,与人肝癌影像学表现相似。通过对3组动物介入处理后发现:动物的异常表现以B组最明显,A组与C组表现较轻。到处死动物前,B组动物体重下降明显,与A、C组相比差异有统计学意义;A、C二组相比差异无统计学意义。结果显示:槐耳清膏可改善兔肝移植瘤TACE术后的生存状态,减少动物TACE术后体重下降。

恶性肿瘤细胞的形态、代谢和功能均有异常,不同程度的失去了分化成熟的能力^[8],其细胞增殖是克隆性的,肿瘤细胞生长旺盛,失去控制,具有相对自主性,肿瘤性增殖常常在局部形成肿块。肿瘤的进行性生长及生长速度,与肿瘤细胞的生成和死亡的比例有关,在肿瘤生长过程中由于营养供应和抗肿瘤反应等因素的影响,有一些肿瘤细胞会死亡,肿

瘤细胞的生成与死亡的比例,在很大程度上决定肿瘤是否能继续生长,以多快的速度生长。所以,肿块大小的变化、肿瘤的坏死情况可以衡量肿瘤的生长情况及抗肿瘤治疗的效果。本实验发现 3组动物介入治疗后 14天肿瘤体积、肿瘤生长率和肿瘤坏死率 B组、C组与 A组相比差异具有统计学意义,B组与 C组相比差异具有统计学意义。显示介入治疗对肝移植瘤有明显治疗作用,槐耳清膏可以增加介入的治疗效果。

恶性肿瘤可以通过多种途径扩散到身体其他部位,这是恶性肿瘤最重要的生物学特点,也是导致患者死亡的主要原因。TACE虽然可以控制局部肿瘤生长,但有作者认为 TACE术后肿瘤细胞残存,肿瘤包膜不完整,肿瘤细胞更易脱落通过血液和淋巴转移^[9]。也有研究显示 TACE术后肺转移者并未明显增加^[10]。本实验通过对肝、肺和腹腔淋巴结的转移研究发现:兔移植瘤单纯 TACE组肝、肺和腹腔淋巴结的转移与对照组相比无明显差别,这可能与动物数量少和观察时间短有关;槐耳清膏可以抑制 TACE术后肝和肺的转移;槐耳清膏对 TACE术后腹腔淋巴结的转移无明显影响,可能与肝移植瘤向外生长,突破肝表面发生腹腔种植转移与腹腔淋巴结不易区分有关。

综上所述:槐耳清膏可以改善 TACE术后患者的生存质量,防止体重下降;促进肿瘤坏死,抑制肿

瘤生长和转移。

参考文献

- 1 Liado L, Virgili J, Figueras J, et al. A prognostic index of the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Cancer*, 2000, 88: 50
- 2 Higuchi T, Kikuchi M, Okazaki M. Hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic arterial embolization: a histopathologic study of 84 resected cases. *Cancer*, 1994, 73: 2259
- 3 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, 21: 1846
- 4 叶任高. *内科学*. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 471
- 5 徐戈良, 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
- 6 黄涛, 孔庆志, 卢宏达, 等. 槐耳清膏诱导人肺腺癌细胞 A549 凋亡的实验研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24: 487
- 7 Chen L, Lu ZX, Lu P, et al. Anticancer Effect of PS-T on the Experimental Hepatocellular Carcinoma. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2004, 3: 55
- 8 李玉林. *病理学*. 北京: 人民卫生出版社, 2005, 102
- 9 Boix L, Bruix J, Castells A. Circulating mRNA for alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma: Evidence of tumor dissemination after transarterial embolization. *Hepatology*, 1996, 24: 349
- 10 Lin SC, Shih SC, Kao CR, et al. Transcatheter arterial embolization treatment in patients with hepatocellular carcinoma and risk of pulmonary metastasis. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 1208

(收稿: 2008 - 05 - 14 修回: 2008 - 06 - 16)