

· 论 著 ·

# 重组人血管内皮抑素联合 TACE 抗大鼠 Walker-256 细胞移植性肝癌血管生成的作用\*

张宝南, 魏治鹏

(江苏省无锡市中医医院肿瘤科 214001)

**摘要:**目的 探讨重组人血管内皮抑素(rh-ES)联合肝动脉化疗栓塞术(TACE)对大鼠移植性 Walker-256 肝癌模型血管内皮生长因子(VEGF)表达和微血管密度(MVD)影响,评价 rh-ES 与 TACE 联合治疗对抑制大鼠移植性肝癌模型血管生成的疗效。方法 建立 Wistar 大鼠 Walker-256 肝癌模型,1 周后随机分成治疗组和对照组,每组各 20 只。治疗组肝动脉内注入 rh-ES-碘化油阿霉素乳剂,对照组肝动脉内注入碘化油阿霉素乳剂。术后 1 周取出肝内肿瘤组织,用免疫组织化学方法检测两组肿瘤组织内 VEGF 的表达和 MVD。结果 两组术后肿瘤体积均缩小,两组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。治疗组及对照组肿瘤组织 VEGF 表达分别为 $(31\pm 17)\%$ 和 $(41\pm 12)\%$ ,MVD 分别为 $(21\pm 12)$ 条和 $(30\pm 10)$ 条,两组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 rh-ES 与 TACE 联合治疗可以明显降低肿瘤 VEGF 表达和 MVD,有一定抗移植性肝癌血管生成的作用。

**关键词:**癌,肝细胞;血管内皮生长因子类;重组人血管内皮抑素;肝动脉化疗栓塞术;微血管密度

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.32.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)32-3230-02

Anti-angiogenesis effect of transcatheter arterial chemoembolization combining rh-ES in the rat Walker-256 hepatic implantation tumor\*

Zhang Baonan, Wei Zhipeng

(Department of Oncology, Wuxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuxi, Jiangsu 214001, China)

**Abstract:** **Objective** To study the expression of microvascular density (MVD) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in hepatic implantation tumor after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) combining recombinant human endostatin (rh-ES) and to evaluate the therapeutic effect and angiogenesis of the rat hepatic implantation tumor. **Methods** According to the method introduced by the documents, forty rats with implanted tumors were randomly divided into two groups, with twenty in each group. The treatment group were treated with TACE combining rh-ES. The control group were treated with TACE only. 7 days after embolism, the hepatic implantation tumors were taken out, and the growth rates of the tumors were calculated, then immunohistochemistry were performed to demonstrate the expression of VEGF and MVD. **Results** The size of the tumor decreased after the treatment. There was no significant difference between treatment group and control group ( $P>0.05$ ). The expressions of VEGF protein were detected by immunohistochemistry, whose expression value were  $(31\pm 17)\%$  in the treatment group and  $(41\pm 12)\%$  in the control group, showing significant difference between the two groups ( $P<0.05$ ). The expression of MVD were  $(21\pm 12)$  strips and  $(30\pm 10)$  strips respectively in two groups, showing significant difference between them ( $P<0.05$ ). **Conclusion** TACE combining rh-ES can significantly reduce the expression of VEGF and MVD and inhibit the angiogenesis of the tumor, which shows that rh-ES has inhibitory effects on antiangiogenesis after TACE.

**Key words:** carcinoma, hepatocellular; vascular endothelial growth factor; recombinant human endostatin; transcatheter arterial chemoembolization; microvessel density

肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是临床上中、晚期肝癌的重要治疗手段。但临床研究表明, TACE 治疗的患者很难达到手术治疗的效果, 肿瘤复发和转移是影响患者疗效的主要原因。患者行 TACE 后血清中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)往往明显升高, 提示肿瘤周围血管丰富和侧支循环建立, 为肿瘤的复发和转移提供了依据<sup>[1-2]</sup>。因此, 抗肿瘤血管生成成为治疗肿瘤的重要手段。重组人血管内皮抑素(recombinant human endostatin, rh-ES)是抗血管生成的代表药物, 能特异性地作用于新生血管内皮细胞, 对抗 VEGF 的促血管生成而发挥作用<sup>[3-5]</sup>。因此, 本研究通过建立成年 Wistar 大鼠移植性肝癌模型, 采用 rh-ES 联合 TACE 的方法, 通过观察肿瘤组织内 VEGF 和微血管密度(microvessel density, MVD)的表达, 探讨 rh-ES 在 TACE 中的抗血管生成的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物与试剂** 取 40 只雄性、体质量为 180~250 g 的

Wistar 大鼠, 5 只传种 Wistar 幼鼠, 均购自上海中国科学院细胞所动物房。Walker-256 瘤株购自上海医药工业研究院。鼠抗人单克隆 VEGF 抗体、兔抗人单克隆 CD34 抗体均购自福州迈新生物技术有限公司。阿霉素购于深圳万乐有限公司, 超液化碘油购于法国 Cuerbet 公司, rh-ES(商品名: 恩度)由江苏先声药业提供。

**1.2 栓塞剂配制** 阿霉素碘化油乳剂制备: 取阿霉素 50 mg 加超液化碘油 10 mL 充分乳化; rh-ES-阿霉素碘化油乳剂制备: 取 rh-ES 30 mg(2 支)混入阿霉素碘化油乳剂中充分乳化。

**1.3 动物模型的建立** 无菌条件下, 将 Walker-256 瘤株从液氮中复苏并增殖至  $4\times 10^6$  个细胞, 注入传种大鼠腹腔, 1 周后大鼠出现癌性腹水。抽出癌性腹水 0.5~1.0 mL 注入另一只大鼠腋下, 1 周后在皮下长出约 1 cm<sup>3</sup> 大小实体瘤。断颈处死荷瘤大鼠, 无菌条件下取出实体瘤, 并切取皮下瘤块, 挑选无出血及坏死的肿瘤组织, 用利刀片切成 2 mm×2 mm×2 mm 大小的小块备用。另取大鼠 40 只, 腹腔注射麻醉, 在腹正中切开

\* 基金项目: 无锡市科学技术局基金资助项目(CSZ00858)。

皮肤 1.0 cm 左右,用显微组织镊子将肝包膜截一小口,将肿瘤块沿隧道嵌入,明胶海绵堵塞窦口,移植完毕后逐层缝合腹壁,饲养待用。

**1.4 TACE 方法** 7 d 后将荷瘤大鼠随机分为治疗组与对照组,每组各 20 只。再次麻醉后固定,剖腹,暴露肝脏,于手术显微镜下在胃十二指肠动脉上切一小口,由此插入特制微导管,上行进入肝固有动脉,治疗组注入 2~3 mL/kg rh-ES-阿霉素碘化油乳剂,而对照组注入 2~3 mL/kg 阿霉素碘化油乳剂。7 d 后处死所有大鼠,留取肿瘤组织,用 SP 法检测 VEGF 表达和 MVD。

**1.5 免疫组织化学检查** 采用免疫组织化学 SP 法。固定好组织标本后常规脱水,石蜡包埋,每个肿瘤组织作 4 μm 连续切片,苏木素-伊红染色,采用 SP 法进行免疫组织化学染色,进行 VEGF 表达水平和 MVD 的检测。

**1.6 结果判定标准** VEGF 表达以细胞质出现浅黄色、棕黄色或褐黄色颗粒为阳性。高倍镜下(×400)每张切片采用图像分析仪读取阳性细胞数,分别记录每 2 000 个细胞中所含的阳性细胞数。MVD 的计数:参照 Weidner 方法并加以改进,凡是染成棕色的单个内皮细胞或内皮细胞成簇出现,并能和相邻的血管、肿瘤细胞以及间质成分相分隔的,就作为 1 个微血管计数。首先在低倍镜下(×100 倍)观看全片,寻找肿瘤内血管清楚且微血管数最多的区域,然后在高倍镜下(×400 倍)计数这一视野的微血管数。

**1.7 统计学处理** 用 SPSS12.0 软件处理数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$ ,采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 肝移植瘤形态学观察** 处死荷瘤大鼠,无菌条件下取出实体瘤后可见类圆形肿块,肿瘤色白、质韧,与正常肝组织无明显分界,部分突出于肝脏轮廓之外,剖面呈灰白色鱼肉样组织,质中等,见插 II 图 1。行 TACE 后两组肿瘤组织均可见点、片状坏死灶,部分可见液化坏死,剖开后有暗红色浓稠坏死物流出,形成壁厚薄不均的残余瘤腔,见插 II 图 2。其中治疗组最大剖面坏死灶数为(8±4)个,而对照组为(6±3)个,但两组比较差异无统计学意义( $t=1.788\ 9, P=0.081\ 6$ ),见表 1。

**2.2 两组肿瘤增长率比较** 利用肿瘤的最大径和最小径计算肿瘤手术前、后的体积,观察其变化情况。治疗组和对照组肿瘤增长率均为负增长,其中治疗组肿瘤增长率为(-20.4±16.7)%,对照组为(-12.9±6.7)%,见表 1。治疗组肿瘤体积缩小超过 30%的比率为 50%,而对照组肿瘤体积缩小超过 30%的比率为 20%,治疗组肿瘤体积较对照组缩小明显,但两组比较差异无统计学意义( $t=1.864\ 0, P=0.070\ 1$ ),见表 1。

表 1 移植瘤组织中坏死灶个数、肿瘤增长率、VEGF 和 MVD 检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 坏死灶数(个) | 肿瘤增长率(%)   | VEGF(%) | MVD(条)  |
|----------|---------|------------|---------|---------|
| 对照组      | 6±3     | -12.9±6.7  | 41±12   | 30±10   |
| 治疗组      | 8±4     | -20.4±16.7 | 31±17   | 21±12   |
| <i>t</i> | 1.788 9 | 1.864 0    | 2.149 2 | 2.576 7 |
| <i>P</i> | 0.081 6 | 0.070 1    | 0.038 1 | 0.014 0 |

**2.3 两组 VEGF 蛋白表达比较** 免疫组织化学检查显示,VEGF 蛋白在肿瘤中呈弥散性表达,呈棕黄颗粒分布,在肿瘤边缘以及坏死周围的瘤巢中表达较强。VEGF 表达部位主要集中在肿瘤细胞的细胞质、肿瘤周围肝细胞质、细胞膜,以及部分成纤维细胞中,其中治疗组 VEGF 表达为(31±17)%,对照组 VEGF 表达为(41±12)%,两组比较差异有统计学意义( $t=2.149\ 2, P=0.038\ 1$ ),见插 II 图 3、4 和表 1。

**2.4 两组 MVD 比较** CD34 阳性染色表达定位于血管内皮细胞上,并能与相邻的微血管、肿瘤细胞或其他组织分开,呈现黄色或棕黄色颗粒状、条状、裂隙状、簇状和不规则管腔等不同形态。治疗组表达为(21±12)条,对照组表达为(30±10)条,两组比较差异有统计学意义( $t=2.576\ 7, P=0.014\ 0$ ),见插 II 图 5、6 和表 1。

3 讨 论

目前,肝癌患者行 TACE 后的复发和转移仍然是影响肝癌患者长期存活的主要因素<sup>[6-7]</sup>,其主要原因为 TACE 后残留肿瘤组织因急剧缺血缺氧刺激下游基因如 VEGF、p53、金属基质蛋白酶(MMPs)等的表达,尤其是上调 VEGF 的表达,促使肿瘤周围微血管生成以满足肿瘤的营养需求而使得肿瘤细胞存活下来<sup>[8-10]</sup>。VEGF 是目前已知最强的促血管生长因子,对血管内皮细胞的促有丝分裂作用十分强烈,在体内可刺激血管的发生和生长,参与肿瘤新生血管的每一个过程,处于新生血管形成的核心地位,而 rh-ES 被视为抗肿瘤血管生成治疗中最具前途的药物之一,能封堵 VEGF 受体——VEGFR-1(Flk-1)、VEGFR-2(Flk-1/KDR)、VEGFR-3(Flk-4),阻断 VEGF 受体的酪氨酸磷酸化,阻断 VEGF 介导的信号转导;阻止血管内皮细胞与 VEGF 的结合,下调 VEGF mRNA 和蛋白表达,从而抑制 VEGF 介导的内皮细胞迁移和血管生成<sup>[11]</sup>。rh-ES 用于肝细胞癌的治疗已陆续有相关文献报道。赵登玲等<sup>[12]</sup>发现 rh-ES 联合 TACE 治疗兔 VX2 肝癌 2 周后,肝癌生长率较对照组明显减低,且 VEGF、MVD 表达较对照组明显减低,表明 rh-ES 能显著地发挥抗血管生成效应,从而抑制了 TACE 后肿瘤复发、转移的潜在性。本实验建立了动物移植瘤模型,采用头对头的比较方法。治疗组中由于 rh-ES 的存在,抑制了血管内皮细胞的生长,残留的肿瘤细胞在没有营养供应下发生凋亡,肿瘤生长受到抑制;而对照组由于缺乏 rh-ES,无法抑制 TACE 后的 VEGF 表达升高,故对照组中 VEGF 和 MVD 的表达较治疗组高。

从本实验数据结果比较治疗前后 VEGF、MVD 变化来看,进一步证明了 rh-ES 在 TACE 中的抗血管生成的作用。采用联合 rh-ES 和 TACE 治疗的方法可以克服单一治疗方式的局限性,发挥各自优势,获得任何一种单一治疗方式都无法获得较理想的治疗效果。单纯 TACE 很难彻底杀灭肿瘤细胞,而 rh-ES 主要抑制肿瘤新生血管,而对已形成的肿瘤血管作用不大。因此二者联合可以弥补各自不足,阻断肿瘤血供的同时抑制新生血管的生成,从而达到肿瘤坏死的同时抑制肿瘤复发和转移的目的<sup>[13-14]</sup>。

本实验从抗血管生成这一新的角度探讨了 rh-ES 抗肝癌血管生成的作用机制,结果显示 rh-ES 能抑制大鼠 Walker-256 肝癌的生长,肿瘤组织内的 VEGF、MVD 表达下降。但是本实验的大鼠 Walker-256 肝癌模型是建立在正常肝组织上,Walker-256 瘤株也不是真正意义上的肝癌细胞株。人类的肝癌往往是在肝脏疾病基础上发生的,因此 Walker-256 肝癌模型与人肝癌的生物学行为还有很大区别;同时本实验中未对实验动物进行肝、肾功能以及血液生化检查,因此, rh-ES 在临床上应用的疗效和不良反应还需进一步探索。

参考文献:

[1] 钦伦秀,孙惠川,汤钊猷.原发性肝癌研究进展——2006 沪港国际肝病大会纪要[J].中华外科杂志,2006,44(15):1070-1074.  
[2] 陈晓明,罗鹏飞.肝癌经导管肝动脉化(下转第 3235 页)

- Mutat Res,2002,511(2):145-178.
- [9] Sakamoto M,Kondo A,Kawasaki K,et al. Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer lines and tissues cDNA microarray[J]. Hum Cell,2001,14(4):305-315.
- [10] Mansouri A,Zhang Q,Ridgway LD,et al. Cisplatin resistance in an ovarian carcinoma is associated with a defect in programmed cell death control through XIAP regulation[J]. Oneol Res,2003,13(6/10):399-404.
- [11] Katano H,Kondo A,Safaei R,et al. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper[J]. Cancer Res,2002,62(22):6559-6565.
- [12] Rosell R,Taron M,Barnadas A,et al. Nucleotide excision repair pathways involved in cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Control,2003,10(4):297-305.
- [13] Altaha R,Liang X,Yu JJ,et al. Excision repair cross complementing group 1: gene expression and platinum resistance[J]. Int J Mol Med,2004,14(5):959-970.
- [14] Joshi MB,Shirota Y,Danerberg KD,et al. High gene expression of TS1,GSTP1 and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer[J]. Clin Cancer Res,2005,11(8):2215-2221.
- [15] Langer R,Specht K,Becker K,et al. Association of pretherapeutic expression of chemotherapy-related genes with response to neoadjuvant chemotherapy in barrett carcinoma[J]. Clin Cancer Res,2005,11(9):7462-7469.
- [16] Metzger R,Leichman CG,Danenber KD,et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy[J]. J Clin Oncol,1998,16(3):309-316.
- [17] Reed E,Dabholkar M,Thornton K,et al. Evidence for in the appearance of mRNAs of nucleotide excision repair genes, in human ovarian cancer tissues[J]. Oncol Rep,2000,7(11):1123-1128.
- [18] Shirota Y,Stoehlmacher J,Brabender J,et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy[J]. J Clin Oncol,2001,19(5):4298-4304.
- [19] Warnecke-Eberz U,Metzger R,Miyazono F,et al. High specificity of quantitative excision repair cross-complementing 1 messenger RNA expression for prediction of minor histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer[J]. Clin Cancer Res,2004,10(7):3794-3799.
- [20] Chang IY,Kim MH,Kim HB,et al. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin[J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,327(1):225-233.

(收稿日期:2011-07-28 修回日期:2011-09-07)

(上接第 3231 页)

- 性栓塞存在的问题与对策[J]. 实用医学杂志,2007,23(6):786-787.
- [3] Jubb Am,Hurwitz HI,Bai W,et al. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression,thrombospondin-2 expression,and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer[J]. Clin Oncol,2006,24(2):217-227.
- [4] 王革芳,程永德,王咏梅,等. 静脉滴注重组人血管内皮抑素联合动脉灌注化疗治疗晚期恶性肿瘤的临床观察[J]. 介入放射学杂志,2009,18(4):270-273.
- [5] 王金万,孙燕. 重组人血管内皮抑素Ⅲ期临床研究[J]. 中国前沿医学,2006,3(8):87-90.
- [6] Hansen S,Sorensen FB,Vach W,et al. Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients[J]. Histo Pathology,2004,44(5):428-436.
- [7] 宁厚法,王滨,曹贵文,等. 经导管肝动脉化疗栓塞术(TACE)对肝细胞癌凋亡相关蛋白 fas,bax 和 bel-xl 表达影响的相关研究[J]. 实用放射学杂志,2004,20(3):248-250.
- [8] 汤日杰,李伟,何丽珍,等. 肝动脉化疗栓塞联合血管内皮抑素治疗肝癌的试验及临床应用[J]. 研究热带医学杂志,2010,10(7):788-783.
- [9] 王滨,徐辉,曹贵文,等. 肝动脉化疗栓塞对肝癌肿瘤新生血管生成及血管内皮细胞生长因子表达的影响[J]. 中华放射学杂志,2005,39(2):204-206.
- [10] 吴穷,秦叔逵,王杰军. 血管内皮抑素的临床前研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2008,13(3):271-277.
- [11] Ling Y,Yang Y,Lu N,et al. Endostar,a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2007,361(1):79-84.
- [12] 赵登玲,邓钢,李光超,等. 经肝动脉灌注重组人血管内皮抑制素联合 TACE 治疗兔 VX2 肝癌及肿瘤血管生成的评估[J]. 肿瘤,2008,28(1):211-215.
- [13] Kong SY,Park JW, Lee JA,et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and survival in hepatocellular carcinoma patients[J]. Hepatology,2007,46(2):446-455.
- [14] 钱骏,Vossoughi D,Oppermann E,等. 血管生成抑制剂烟曲霉素衍生物在介入治疗肝细胞癌实验中的应用[J]. 中华放射学杂志,2006,40(1):13-16.

(收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-08-12)