

• 实验研究 Experiment research •

土贝母皂苷微囊栓塞肝癌对血管内皮生长因子表达的影响

郭万亮, 刘振堂, 戴社教, 周 斌, 石三利

【摘要】 目的 观察土贝母皂苷微囊栓塞对肝癌抑制和血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,评价土贝母微囊栓塞效果。**方法** 将成功接种 VX2 瘤株的 40 只新西兰大白兔随机分为 3 组, A 组 13 只, 生理盐水 1 ml 肝动脉灌注; B 组 13 只, 碘油 1 ml 加 1 mg 丝列霉素混悬液肝动脉化疗栓塞; C 组 14 只, 土贝母微囊 5.1 mg/kg 肝动脉栓塞。栓塞后 1 周取材, 制备光镜、电镜标本, 应用免疫组化 SP 法检测肿瘤组织 VEGF 表达情况。**结果** 36 只兔成功行肝动脉造影和栓塞; 栓塞后土贝母微囊组、化疗栓塞组肿瘤体积有所缩小, 对照组体积明显增大, 3 组间具有统计学差异 ($P < 0.05$)。对照组、化疗栓塞组、土贝母微囊组 VEGF 阳性率分别为 83.3%、91.7%、91.7%, 3 组间无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论** 土贝母皂苷微囊栓塞后 VEGF 表达未见明显增高, 肿瘤生长得到抑制, 可以作为理想的末梢栓塞剂。

【关键词】 肝癌; 土贝母皂苷; 微囊栓塞剂; 血管内皮生长因子

中图分类号: R73.36 文献标识码: A 文章编号: 1008-794X(2006)-12-0738-04

Experimental study of tubeimoside microcapsule embolization on the expression of VEGF in hepatic carcinoma GUO Wan-liang, LIU Zhen-tang, DAI She-jiao, ZHOU Bin, SHI San-li. Radiologic Department, Children's Hospital Affiliated to Suzhou University, Suzhou 215003, China

【Abstract】 Objective To study and evaluate the influence of tubeimoside microcapsule embolization on the expression of VEGF and the anti-tumor effect for hepatic carcinoma. **Methods** 40 VX2 liver tumor implanted rabbit models were randomizedly divided into control, chemoembolization and tubeimoside microcapsule embolization groups; with saline 1 ml/kg perfusing into hepatic artery, lipiodol 1 ml/kg plus MMC hepatic arterial embolizations and tubeimoside microcapsules 5.1 mg/kg were carried out in the above mentioned three groups respectively. The expressions of VEGF were detected by the immunohistochemical and optic together with electromicroscopic methods in routine paraffin-embedded section 1 week after embolization. **Results** Among the 36 successful arterial angiographies and embolizations showed tumor mass shrinkage in tubeimoside microcapsule and chemoembolization groups, but conspicuous enlargement in control group, with significant statistical difference between the fore-mentioned groups ($P < 0.05$), with VEGF positive rates of 83.3%, 91.7%, and 91.3% respectively revealing no statistical difference. **Conclusion** Tubeimoside microcapsule embolization provides inhibition on tumor growth and VEGF expression and thus be considered as the proper peripheral embolization agent. (J Intervent Radiol, 2006, 15: 738-741)

【Key words】 Liver tumor; Tubeimoside; Microcapsule embolization agents; Vascular endothelial growth factor

土贝母是块茎类植物, 具有抗病毒、抗肿瘤、提高免疫力和杀精子等多种药理作用, 其中抗肿瘤作用研究较为广泛。研究表明, 土贝母对多种人类恶

性肿瘤细胞株, 如胃癌、胰腺癌、结肠癌、子宫颈癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、白血病、肝癌等具有抑制作用^[1]。本课题组已将土贝母皂苷制成微囊栓塞剂, 并应用于体外实验和健康兔。兔 VX2 肾癌经肾动脉栓塞, 系列研究表明其有良好的化疗栓塞作用。为进一步探索其对肝癌的栓塞效果和对肿瘤复发转移的影响, 本研究用土贝母皂苷微囊栓塞兔 VX2 肝癌, 观察栓塞后血管内皮生长因子(VEGF)表达情

作者单位: 215003 江苏 苏州大学附属儿童医院放射科 (郭万亮); 西安交通大学第二医院影像中心 (刘振堂、戴社教、周斌); 西安市第八医院放射科 (石三利)

通讯作者: 郭万亮

况和组织学、超微结构改变,评价其栓塞效果和栓塞后侧支循环形成状况。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验动物 新西兰纯种大白兔 45 只,体重为 2.4 ~ 3.1 kg,雌雄不限,4 ~ 5 月龄,由西安交通大学医学院动物实验中心提供。

1.1.2 肿瘤细胞来源 VX2 瘤细胞株由第四军医大学唐都医院介入科张洪新主任馈赠。

1.1.3 3 F 同轴 SP 微导管 美国 COOK 公司。

1.1.4 VEGF 多克隆抗体(1:100),武汉博士德生物公司。SP 免疫组化试剂盒,武汉博士德生物公司。

另有应用仪器为荷兰 PHILIPS integris Allura monoplane 1250 mA 大功率 C 型臂数字减影机和透射式电子显微镜,日本日立公司 H-600。

1.2 方法

1.2.1 肝癌模型制作 开腹直视下充分暴露兔肝左叶,经肝包膜注入生理盐水与瘤块的混悬液约 1.0 ml/只。具体模型制作及插管造影参照张洪新等^[2]方法,接种后 7、10、14、18、21、28 d 应用彩色多普勒观测肿瘤形态、血供和血流动力学情况,动态检测肿瘤体积改变($V = 0.5a \times b^2$, a 为肿瘤最大径, b 为肿瘤最短径),并绘制肿瘤体积改变对时间变化的生长曲线。并同时应用螺旋 CT 扫描、核磁共振扫描检测肿瘤的生长状况及形态学变化。接种后第 3 周,将接种成功的 40 只新西兰大白兔随机分为 3 组, A 组 13 只,肝动脉灌注生理盐水 1 ml; B 组 13 只,碘油 1 ml 加 1 mg 丝裂霉素混悬液作肝动脉化疗栓塞; C 组 14 只,土贝母微囊经肝动脉栓塞,微囊参考用量 5.1 mg/kg。

栓塞后 1 周,麻醉后取材,立即制备电镜标本和组织学标本,肉眼观察肿瘤大小及生长情况,并沿肿块最大断面切开,分别测量肿瘤大小和肿瘤直径。

1.2.2 免疫组化染色

1.2.2.1 实验对照:阳性对照由武汉博士德生物公司提供阳性对照片,染色后均为阳性;以 PBS 液代替一抗作阴性对照,结果均为阴性。

1.2.2.2 免疫组化结果判定:VEGF 染色阳性均定位于细胞质,为黄褐色。VEGF 采用 Yano 等^[3]的判定标准,由病理科 2 名不知实验设计的主治医师观察,高倍镜视野下随机记数 100 个细胞,VEGF 阳性染色细胞小于 5% 为阴性,5% ~ 15% 为弱阳性,15% ~ 50% 为阳性,大于 50% 为强阳性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 分析软件,观察指标采用均数加减标准差 ($\bar{x} \pm s$),多组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法;半定量资料用 Kruskal-Wallis 检验,多组间两两比较用 Dann 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤生长监测

分别于接种后第 7、10、14、18、21 d 彩超测量肿瘤的最大径、最小径,计算出肿瘤的体积分别为 102、568、1 482、2 592 和 6 050 mm³。绘出肿瘤生长曲线(图 1)。

2.2 栓塞后肿瘤体积、病理学及超微结构改变

2.2.1 栓塞前后 3 组间肿瘤体积及生长曲线、肿瘤生长率(治疗前体积/治疗后体积 $\times 100\%$) 见图 2、表 1。

2.2.2 肿瘤大体形态改变 36 只成功行肝动脉造影和栓塞;4 只意外死亡,其中 A 组、B 组各 1 只, C 组 2 只。VX2 肝癌在肝内呈浸润性,呈灰白色鱼肉样结节,质中等,无包膜,其周边和内部有较多血管;土贝母皂苷微囊栓塞后肿瘤表面呈灰白色缺血性改变,切开肿瘤见肿瘤断面坏死区不规则,呈豆腐渣样、苍白色;肿瘤周围正常肝组织边缘亦可见条带状灰白色梗死区。沿肿瘤最大切面切开,肉眼及光镜下观察瘤组织坏死情况。

2.2.3 栓塞后组织学和超微结构改变 对照组肿瘤中心可见局灶性小片状坏死,坏死为轻度。瘤巢周围可见被浸润的肝索结构,正常肝组织细胞受压。化疗栓塞组和土贝母微囊组肿瘤中心可见大片凝固性坏死,坏死为重度(图 3),可见无定型物质,瘤细胞崩解,肿瘤周边较多浆细胞、淋巴细胞浸润。

A 组可见肿瘤细胞体积较大,核巨大,核仁发达,核质比例增高,细胞核以常染色质为主,细胞质内可见大量线粒体、内质网、核糖体和少量空泡,凋亡细胞及凋亡小体数量较少。B 组见瘤细胞肿胀、坏死,细胞核不规则,核内染色质块状凝聚、边集,沿核周分布,细胞质内细胞器结构不清,可见到凋亡细胞、凋亡小体及吞噬凋亡小体的瘤细胞。C 组见瘤细胞大部分坏死,细胞核内染色质团块状凝集,沿核周分布,细胞质成分大部分溶解,细胞器消失,部分瘤细胞仅有裸核。多数瘤细胞核呈凋亡样改变,凋亡小体多见(图 4)。

2.3 VEGF 表达

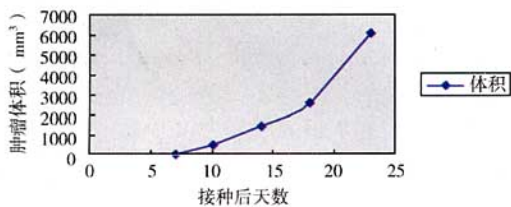


图 1 接种 VX2 后肿瘤生长曲线

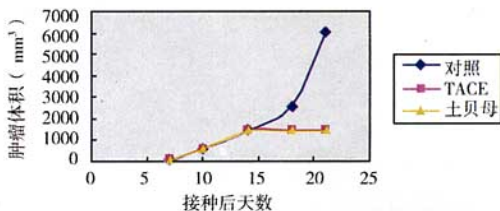


图 2 接种 VX2 后 3 组肿瘤生长曲线

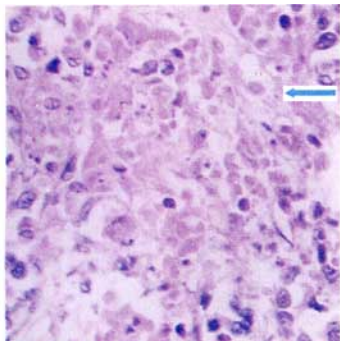


图 3 肿瘤细胞巢状或片状排列, 异形性明显, 可见大片凝固性坏死区, 为栓塞所致

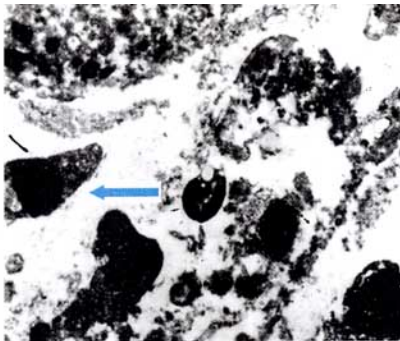


图 4 肿瘤细胞大部分坏死, 细胞质成分溶解, 细胞器消失, 多数瘤细胞呈凋亡改变, 可见凋亡小体

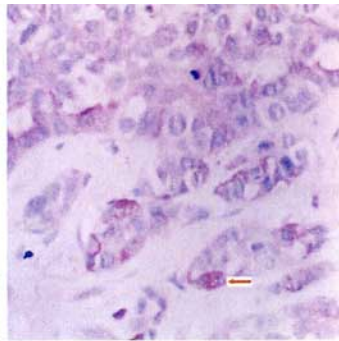


图 5 VEGF 集中表达于肿瘤细胞瘤巢中, 呈黄褐色, 胞质表达

表 1 栓塞前后肿瘤体积及肿瘤生长率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前体积 (mm ³)	治疗后体积 (mm ³)	肿瘤生长率 (%)
对照组	1476 ± 10	6050 ± 24	412 ± 15 ^a
TACE	1482 ± 16	1470 ± 14	99 ± 10 ^b
土贝母微囊	1487 ± 9	1466 ± 20	98 ± 18 ^c

与对照组相比, $P^a < 0.05$, $P^b < 0.05$; 与 TACE 组相比 $P^c > 0.05$

表 2 栓塞后各组 VEGF 表达结果 (例)

分组	例数	VEGF 表达			阳性率 (%)
		+++	++	+	
对照组	12	3	3	4	83.3
化疗栓塞组	12	5	3	3	91.7
土贝母微囊组	12	4	2	5	91.7
检验值		$\chi^2 = 0.96, P > 0.05$			

VEGF 集中或弥漫表达于肿瘤细胞瘤巢中, 呈黄褐色, 细胞质表达较强, 靠近坏死区处表达较强 (图 5)。3 组间 VEGF 表达见表 2。

3 讨论

土贝母是葫芦科假贝母属植物, 古代用其块茎来治疗乳痈、乳腺增生等, 现代临床上常用于治疗病毒性疾病, 皂苷为其主要成分之一, 体外实验表明土贝母皂苷对多种人肿瘤细胞具有抑制作用, 姜世明等^[4]报道土贝母提取物能显著抑制体外培养的肝癌细胞增殖和降低线粒体的代谢活性。杨萍

等^[5]报道土贝母皂苷对人宫颈癌 Hela 细胞生长具有强抑制作用, 且这种作用呈时间剂量依赖关系, 土贝母皂苷使细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡。通过透射电镜观察发现, 土贝母皂苷微囊栓塞后, 细胞核内染色质团块状凝集, 沿核周分布, 细胞质成分大部分溶解, 细胞器消失, 部分瘤细胞仅有裸核, 多数瘤细胞核呈凋亡样改变, 凋亡小体较多, 同时可见明显的细胞坏死表现, 表明土贝母皂苷微囊能有效杀伤肝癌细胞, 诱导肿瘤细胞凋亡。

本实验所用土贝母皂苷微囊采用相分离凝聚法制作^[6], 以乙基纤维素为囊材, 以土贝母皂苷为囊心制成微囊, 土贝母皂苷微囊经肝动脉栓塞后, 组织学发现肿瘤组织大片凝固性坏死, 透射电镜观察除发现肿瘤细胞凋亡明显外, 尚可见瘤细胞大部分坏死, 细胞质成分大部分溶解, 细胞器消失, 可见大量细胞碎片; 同时在观察期内肿瘤生长均得到抑制, 与 TACE 组改变相类似, 表明土贝母皂苷微囊具有化疗栓塞的效果^[7]。其机制为土贝母皂苷微囊有效闭塞肿瘤供养动脉、栓塞动脉的末梢分支, 利用乙基纤维素在体内不能降解, 起到永久性栓塞作用, 造成肿瘤细胞的持续缺血缺氧, 使肿瘤中心部位原本缺血缺氧加重, 从而造成肿瘤组织大片坏死。同时, 土贝母皂苷微囊具有缓释作用, 防止血液“冲刷”, 保证了栓塞区较高、稳定的血药浓度, 发挥

持续杀伤肿瘤细胞和诱导肿瘤细胞凋亡作用。与化疗药物相比,其较小的不良反应为其作为栓塞剂的优势所在。

在肿瘤局部浸润中,血管生成起非常重要的作用,尤其在上皮来源的恶性肿瘤中,肿瘤细胞通过细胞间的相互分离,与基质成分的粘连,细胞外基质的降解和肿瘤细胞的移动,从而发生局部浸润,此乃肿瘤复发和转移的主要根源。但是众多研究表明化疗栓塞对肝癌转移和复发没有显著抑制作用^[8],栓塞可以造成肿瘤组织缺血缺氧,而缺氧是上调 VEGF 表达最主要因素之一^[9];VEGF 可以作为临床评估肝癌复发、转移的潜在指标^[10],VEGF 在肿瘤侧支循环的形成中具有重要地位,是强有力的血管生成因子,其通过与血管内皮细胞膜上酪氨酸激酶受体作用而促使肿瘤血管生成,也为目前肝癌治疗难点所在。本研究结果表明,土贝母皂苷微囊栓塞后,VEGF 表达有增高趋势,但和化疗栓塞、对照组相比,无统计学差异,推测可能为土贝母皂苷和化疗栓塞效果较为持久,造成肿瘤细胞和内皮细胞广泛坏死、凋亡有关,使促血管生成因子分泌减少、旁分泌启动机制受限有关^[11],也可能为土贝母皂苷抑制 VEGF 与其受体结合有关。因此推测栓塞后不会促使血管生成,不会加速肿瘤浸润、转移。胡定慧等^[12]采取鸡囊胚实验得到类似结论,但其详细机制仍需实验证实。

本研究将土贝母皂苷制成微囊栓塞剂,微囊主要栓塞内径范围在 110 ~ 350 μm 的小动脉,能顺利的在导管内注入,组织相容性好,无抗原性和致癌作用,用药范围内无明显不良反应,在 37℃ 生理盐水中浸泡 5 min 后,直径在 50 ~ 280 μm ,膨胀率 25% ~ 55%;在 6 h 内停止膨胀,约 20 d 左右所有微囊破裂^[13],囊材在体内不能被降解,符合长效栓塞剂的要求,且栓塞后肿瘤细胞凋亡、坏死明显,对肿

瘤的侧支循环形成无促进作用,因此土贝母皂苷微囊可以作为较理想的末梢栓塞剂应用于临床研究。

[参考文献]

- [1] 马润娣,于立坚,王永清,等. 土贝母苷甲抗肿瘤活性的研究[J]. 中国肿瘤临床杂志, 1994, 21: 446.
- [2] 张洪新,王执民,王莉君,等. 兔肝移植瘤模型的病理和影像学表现[J]. 实用放射学杂志, 2002, 18: 545 - 548.
- [3] Yano T, Tanikawa S, Fujie M, et al. Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer[J]. Eur J Cancer, 2000, 36: 601 - 609.
- [4] 姜世明,肖正明,宋景贵,等. 土贝母水提物对体外培养人肝癌细胞增殖及代谢的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8: 310 - 313.
- [5] 杨 萍,于廷曦,马润娣,等. 土贝母皂苷诱导人宫颈癌细胞周期阻滞和细胞凋亡[J]. 癌症, 2002, 21: 346 - 350.
- [6] 吴念朱,顾学裘,主编. 药剂学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1987, 132 - 133.
- [7] 李 楠,刘振堂,戴社教,等. 栓塞治疗兔肾 VX2 移植瘤的研究[J]. 实用放射学杂志, 2006, 22: 516 - 519.
- [8] Adachi E, Matsumata T, Nishizaki T, et al. Effects of preoperative transcatheter hepatic arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: the relationship between postoperative course and tumor necrosis[J]. Cancer, 1993, 72: 3593 - 3598.
- [9] Stephan CC, Brock TA. Vascular endothelial growth factor, a multifunctional polypeptide[J]. P R Health Sci J, 1996, 15: 169 - 178.
- [10] 汤钊猷. 临床肝癌学[M]. 上海: 上海科技出版社, 2000, 232 - 236.
- [11] 李 欣,冯敦生,郑传胜,等. 肝动脉化疗栓塞对肿瘤血管生成影响的实验研究[J]. 中华放射学杂志, 2002, 36: 689 - 693.
- [12] 胡定慧,马润娣,于立坚. 土贝母苷甲抑制血管生成[J]. 中国药理学通报, 2003, 19: 713 - 715.
- [13] 朱海云,刘振堂,李兴华. 土贝母皂苷微囊的特性及其用于肾动脉栓塞的实验研究[J]. 中华放射学杂志, 2001, 35: 107 - 109.

(收稿日期:2006-04-13)