

• 实验研究 Experimental research •

不同肝背景下大鼠移植性肝癌肿瘤生长及
TACE 治疗疗效的差异

赵 航, 宋晓磊, 郑 璇, 张煜杰, 周 军

【摘要】 目的 探索正常肝、脂肪肝、肝硬化背景下大鼠移植性肝癌肿瘤生长时各项指标的差异以及 TACE 治疗后疗效的不同。**方法** 将 Walker-256 腹水瘤细胞种植到正常肝、脂肪肝、肝硬化模型大鼠的肝脏内,并对其进行 TACE 治疗。观察 3 组不同肝背景大鼠肿瘤生长时及 TACE 治疗后各项指标的差异。**结果** 3 组不同肝背景肿瘤体积间存在差异,但差异无统计学意义($P>0.05$);治疗前肝功能未见明显差异,治疗后部分肝功能指标脂肪组明显高于硬化组,差异具有统计学意义($P<0.05$);3 组微血管密度未见明显差异($P>0.05$),但在同一组内,治疗前后对比 3 组皆有明显差异($P<0.05$)。**结论** 肿瘤生长过程中:①肿瘤体积存在差异,肝硬化在前期会抑制肿瘤生长,但后期肝硬化大鼠的恶病质状态会加速肿瘤生长;②肝硬化组和脂肪肝组肝功能相似;③微血管密度未见明显差异,但随着肿瘤的增长微血管密度会稍增加。TACE 治疗后:①肿瘤体积未见明显差异;②脂肪肝大鼠相对于肝硬化大鼠有较多的肝功能储备;③微血管密度未见明显差异,但栓塞治疗会刺激微血管的增生。

【关键词】 肝动脉化疗栓塞;肝癌;脂肪肝;肝硬化;疗效差异;CD34

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2024)-10-1095-06

The differences in the growth of transplanted hepatocellular carcinoma and the efficacy of TACE in experimental rats with different liver backgrounds ZHAO Hang, SONG Xiaolei, ZHENG Xuan, ZHANG Yujie, ZHOU Jun. Department of Intervention, Qilu Hospital (Qingdao) of Shandong University, Qingdao, Shandong Province 266000, China

Corresponding author: ZHOU Jun, E-mail: dr.zhouj@163.com

【Abstract】 Objective To explore the difference of various indicators in the growth of transplanted liver cancer in experimental rats with the background of normal liver, fatty liver and liver cirrhosis, and to discuss the difference in the curative effect after TACE. **Methods** Walker-256 ascites tumor cells were implanted into the rats with normal liver, fatty liver, and cirrhosis liver separately to establish the experimental liver cancer models. TACE treatment was performed for all experimental rats. All the indicators related to tumor growth and the curative effect of TACE were compared among the three groups of rats with different liver backgrounds. **Results** In terms of the liver volume, there were differences among the three groups, but the differences were not statistically significant ($P>0.05$). No statistically significant differences in the preoperative liver functions existed among the three groups, but some indicators of postoperative liver functions in the fatty liver group were significantly higher than those in the cirrhosis group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). No significant differences in microvessel density were observed among the three groups ($P>0.05$). However, in the same group statistically significant differences in the above indexes existed between the preoperative values and the postoperative ones ($P<0.05$). **Conclusion** The results of this study indicate that during the growing period of tumor the following three changes can be observed: ① There are differences in tumor volume. Cirrhosis may inhibit tumor growth in the early stage, but in the later stage the cachexia of cirrhosis rats may accelerate tumor growth; ② There were no significant differences in liver functions

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2024.10.010

作者单位: 266000 山东青岛 山东大学齐鲁医院(青岛)介入科

通信作者: 周 军 E-mail: dr.zhouj@163.com

between fatty liver and cirrhosis; and ③ There was no significant difference in microvessel density among the rats with different liver backgrounds. However, with the tumor growing, the microvessel density will be slightly increased. After TACE treatment the following three changes can be observed: ① There is no significant difference in tumor volume; ② Fatty liver rats have more liver function reserve capacity when compared with cirrhotic rats; ③ There is no obvious change in microvessel density, although the embolization treatment can stimulate the proliferation of the microvessel.

【Key words】 hepatic artery chemoembolization; liver cancer; fatty liver; cirrhosis; difference in efficacy; CD34

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见的癌症之一,是全球医疗保健的主要挑战^[1]。近年来,肝癌已经成为全球第六大常见癌症和第二大癌症相关死亡原因且发病率呈上升趋势^[2]。外科手术切除仍是目前世界公认的最有效的措施和首选方法^[3],但由于疾病前期无明显特征,80%患者确诊时已无明确的手术指征^[4],除手术治疗外,还有放疗、化疗、免疫、微创治疗(如消融治疗、TACE 治疗)等多种方法^[1]。其中,TACE 因其众多优点,是目前国内外普遍使用的、公认的疗效最好的方法之一,为不能切除肝癌首选的微创治疗方法^[5]。

随着人民生活水平的提高,肥胖症已在全世界范围内流行。肥胖除了引发代谢和心脑血管疾病外,也是癌症的高危因素,其中胰腺癌和肝癌的相关性最强^[6]。非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是由肥胖、血脂异常和 2 型糖尿病引起的,在全球范围内的患病率高达 25%^[7],从组织学上讲,NAFLD 的特点是肝脏脂肪变性 $\geq 5\%$ ^[8]。NAFLD 作为 HCC 病因的负担似乎在增加。据估计,2018 年至 2030 年 NAFLD 相关 HCC 的年龄标化发病率将从 0.92‰ 上升到 1.18‰^[2]。其中在美国、英国和法国等国家,NAFLD 已是肝癌潜在病因中上升最快的因素^[9]。尽管病毒性肝炎和酒精仍然是最主要原因,但 NAFLD 正迅速成为 HCC 的重要原因,尤其是在西方国家^[1]。目前为止,关于 TACE 治疗在 NAFLD 相关的 HCC (nonalcoholic fatty liver disease-hepatocellular carcinoma, NAFLD-HCC)中的有效性和安全性的文献很少,尚无明确的 TACE 治疗 NAFLD-HCC 的建议,更是缺乏相关的指南^[7]。以脂肪肝背景的肝癌正逐步增加,这种全新的变化为肝癌的 TACE 治疗提出了新的挑战^[10]。本研究将针对 TACE 治疗肝硬化背景下的肝癌和脂肪肝背景下的肝癌疗效是否相同及不同肝背景下肿瘤生长过程中是否也有差异的问题来设计动物实验,以期

为后续临床肝癌诊疗提供一定建议。

1 材料与方法

1.1 构建正常肝、肝硬化、脂肪肝模型

将 36 只 Wistar 大鼠随机分为正常肝背景组、肝硬化组、脂肪肝组,每组 12 只。正常肝背景组:给予正常饲料和无菌水饲养大鼠 10 周。肝硬化背景组:给予正常饲料,并每周 2 次腹腔(左右腹腔各 1 次)注射 50%四氯化碳(CCl_4)橄榄油溶液,剂量为 1 mL/kg,并将 52°乙醇用无菌蒸馏水稀释 10 倍后,作为大鼠唯一饮用水,饲养 10 周^[11]。于每周一测量大鼠体重并记录,如果体重降低超过 10 g,即暂停给药,并将稀释后的乙醇更换为无菌水,直至体重回复^[12]。脂肪肝背景组:给予 60%脂肪含量的高脂饲料,并将无菌水作为唯一饮用水,饲养 10 周^[13-14],如图 1。为防止肿瘤种植及治疗时老鼠因肝功能差而大量死亡,于肿瘤种植时停止造模。

1.2 构建肝癌模型

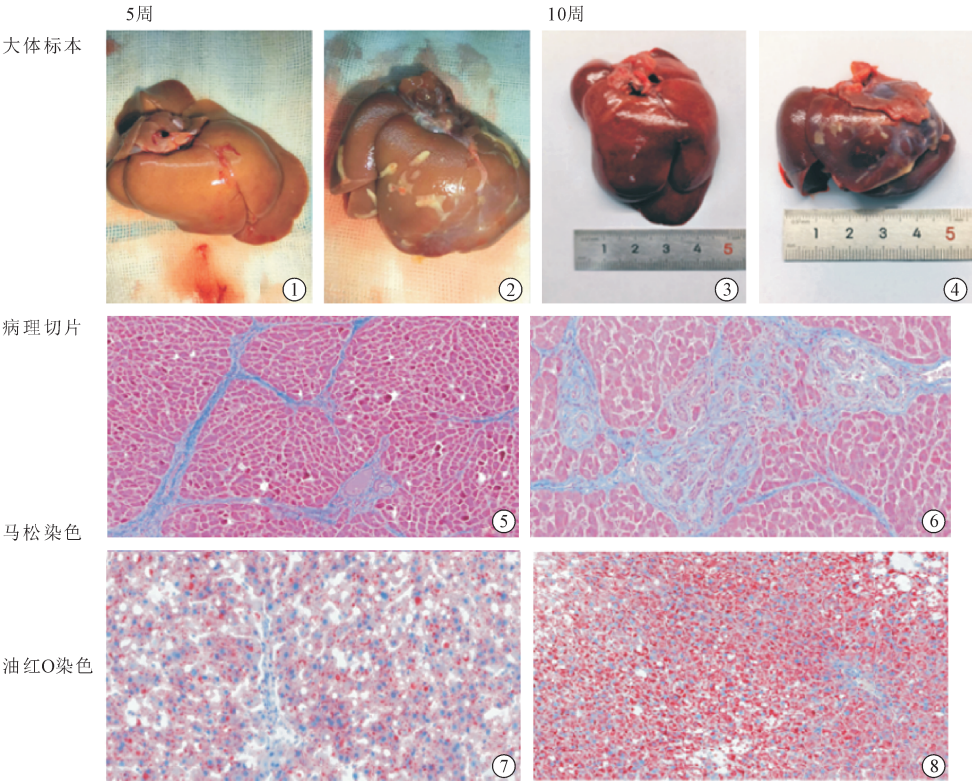
Walker-256 细胞培养和移植采用陈雯等^[15]和江剑平等^[16]的方法:从液氮管中取出细胞系冻存管,复苏。使用幼鼠腹腔传代,取腹水瘤细胞置于冰上备用。将大鼠用异氟烷麻醉,备皮、消毒、开腹。肉眼直视下将大鼠腹水瘤悬液 0.5 mL,注入大鼠肝脏,稍停顿,拔出针管,快速用止血棉签按压 3 min 左右,腹腔注射少量抗生素,关腹。造模结果如图 2。

1.3 大鼠肝癌模型 TACE 治疗

插管技术为赵航等^[17]改良后的新方法:剖腹后找到胃十二指肠动脉,穿线并提起,微血管夹夹闭肝总动脉。用 34 G 针头配 1 mL 针管,将针头缓慢刺入胃十二指肠动脉,缓慢推注药物(表柔比星 0.1 mg + 碘油 0.1 mL)。注射完毕,拔出针头,移除微血管夹,用棉签按压针头刺入点 3~5 min,关腹。治疗过程如图 3。

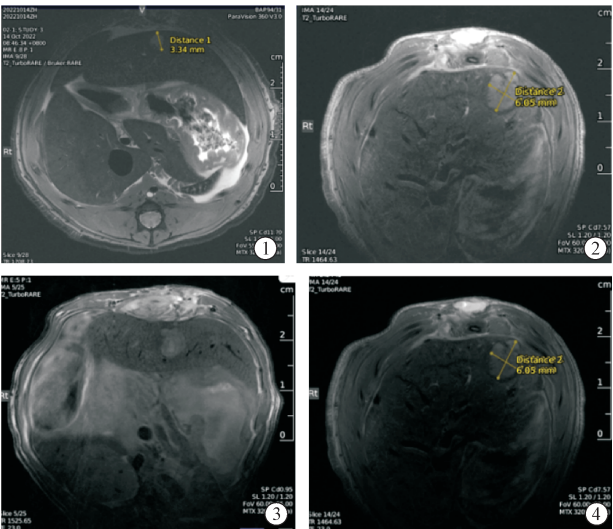
1.4 肿瘤体积测量、生化实验与免疫组织化学染色

大鼠种植肿瘤之日,记为第 1 天。第 1 周时,每



①②为造模 5 周时脂肪肝、肝硬化大体标本；③④为造模 10 周时脂肪肝、肝硬化大体标本；⑤⑥分别为肝硬化马松染色切片；⑦⑧为脂肪肝油红 O 染色切片

图 1 大鼠造模成功



①~④肿瘤种植后,在 MR 下呈现类圆形高信号

图 2 MR 示肿瘤种植成功

组处死 4 只大鼠, TACE 治疗 4 只大鼠, 剩余 4 只大鼠继续饲养。处死后, 心脏取血, 1 500 r/min 离心 5 min, 取上清, 在全自动生化仪自动测定后导出结果, 记录功能 5 项 (ALT、AST、 γ -GT、ALB、TBLL)。剖腹取肝, 沿肿瘤最大横截面切开, 测量肿瘤直径并计算肿瘤体积 (最大直径 \times 与之垂直的

最短直径的平方 $\times 1/2$)。取肿瘤组织, 切片, CD34 染色。镜检, 在 50 倍放大倍数的情况下扫描切片, 并且识别具有较高微血管密度的 5 个区域。在 100 倍放大倍数下进行该区域的微血管计数, 将 5 个高倍镜 ($\times 100$) 视野下的微血管数量的均值视为肿瘤微血管密度, CD34 或 CD31 染色将微血管染为褐色以突出显示^[18-19]。第 2 周时, 将所有大鼠处死, 后续操作同上。对比第 1 周、第 2 周、治疗后大鼠的各种指标。

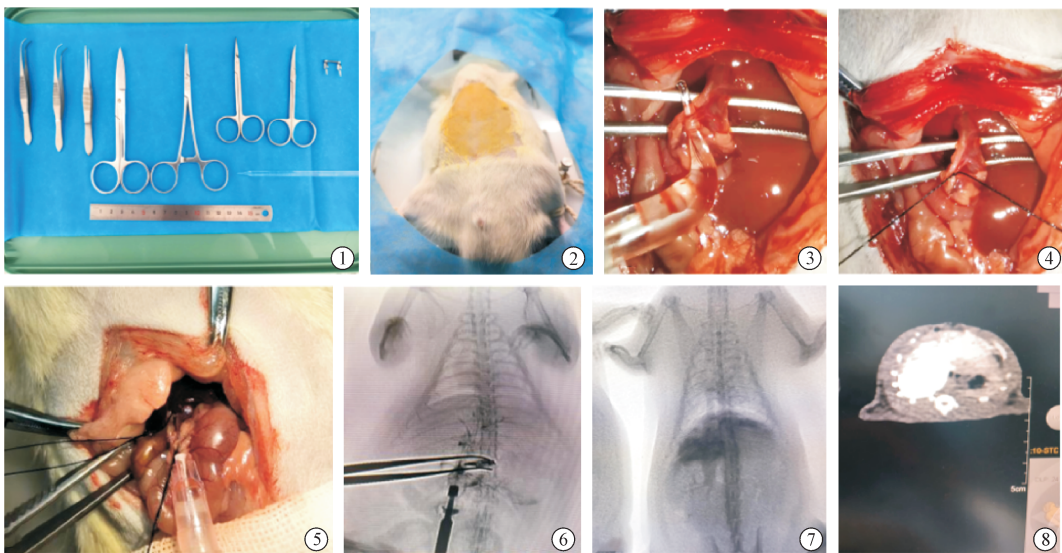
1.5 统计学方法

实验结果用数据和图表表示, 测定值以 Mean \pm SD 表示。采用 SPSS 26.0 软件对相关数据进行统计分析, 为确定组间的显著性差异, 符合正态分布的计量单位两组间比较采用 t 检验, 不符合正态分布的计量资料组间比较采用非参数秩和检验。3 组之间比较采用单因素方差分析。 P 值进行双边测试, $P < 0.05$ 视为具有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤体积比较

每组大鼠肿瘤体积比较如表 1 所示。肿瘤种植



①手术所需器械;②大鼠备皮、消毒、麻醉;③④寻找胃十二指肠动脉;⑤打药;⑥⑦DSA 所示;⑧CT 扫描所示
图 3 大鼠 TACE 治疗过程

1 周时肝硬化组体积明显低于其他两组,2 周时肝硬化组体积明显高于其他两组,TACE 治疗后正常肝组疗效明显优于其他两组,肝硬化组和脂肪组相似。虽数据存在一定差异,但可能由于样本量较小,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 大鼠肿瘤体积比较($\text{mm}^3, \bar{x} \pm s$)			
分组	1 周	2 周	治疗后
正常肝组	176.5 ± 43.2	$1\ 282.5 \pm 597.3$	138.0 ± 33.2
肝硬化组	148.0 ± 35.5	$1\ 851.0 \pm 1\ 101.0$	207.0 ± 89.6
脂肪肝组	157.0 ± 42.0	$1\ 351.0 \pm 192.2$	229.0 ± 76.6
P 值	0.699	0.601	0.312

2.2 肝功能比较

因正常组大鼠在造模时肝功并未受到影响,故只进行脂肪肝组和肝硬化组的比较,见表 2。就 ALT、AST 而言,脂肪肝组和肝硬化组皆因停止造模而恢复部分肝功能,且肝硬化组回落幅度大。治疗后脂肪组指标大于肝硬化组,且差异有统计学意义($P<0.05$)。就 ALB、 γ -GT、TBIL 而言,治疗前后的脂肪肝组和肝硬化组指标皆在正常范围之内。但 TACE 治疗后,ALB、TBIL 肝硬化组指标小于脂肪组且差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 微血管密度比较

3 组间微血管密度在 1、2 周和治疗后未见明显差异($P>0.05$)。但同一组内,治疗前、后微血管密度的对比(2 周:治疗后)有明显差异($P<0.05$),在肿瘤生长过程中(1 周:2 周),密度虽稍增加,但差异不具有统计学意义($P>0.05$)。见表 3、表 4、表 5、图 4。

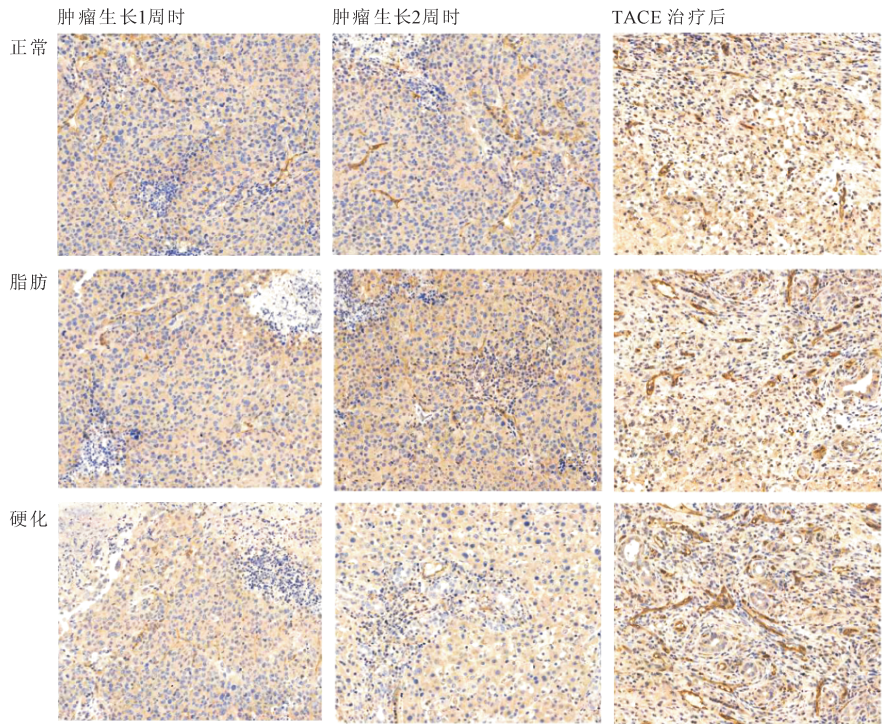
表 2 大鼠肝功能变化			
分组	ALT(U/L, $\bar{x} \pm s$)		
	1 周	2 周	治疗后
脂肪肝组	127.6 ± 27.6	84.1 ± 18.5	163.5 ± 30.0
肝硬化组	146.5 ± 88.0	75.5 ± 9.6	103.1 ± 9.3
P 值	0.705	0.442	0.023
分组	AST(U/L, $\bar{x} \pm s$)		
	1 周	2 周	治疗后
脂肪肝组	325.0 ± 59.9	262.7 ± 72.3	366.7 ± 44.8
肝硬化组	459.4 ± 201.3	233.8 ± 17.3	334.5 ± 32.2
P 值	0.248	0.202	0.352
分组	ALB(g/L, $\bar{x} \pm s$)		
	1 周	2 周	治疗后
脂肪肝组	24.7 ± 3.3	26.2 ± 2.8	30.8 ± 3.5
肝硬化组	29.2 ± 2.2	26.5 ± 1.8	25.7 ± 2.3
P 值	0.083	0.898	0.010
分组	γ -GT(U/L, $\bar{x} \pm s$)		
	1 周	2 周	治疗后
脂肪肝组	8.4 ± 4.0	7.3 ± 0.6	6.3 ± 2.0
肝硬化组	5.1 ± 4.5	4.6 ± 2.0	6.4 ± 1.8
P 值	0.304	0.418	0.936
分组	TBIL($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)		
	1 周	2 周	治疗后
脂肪肝组	14.3 ± 3.7	15.1 ± 10.2	20.2 ± 10.9
肝硬化组	22.3 ± 19.0	18.6 ± 11.2	6.5 ± 2.6
P 值	0.440	0.386	0.044

表 3 大鼠微血管密度的小组内比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	1 周	2 周	治疗后
正常肝组	12.75 ± 1.9	14.25 ± 2.2	26.5 ± 3.9
肝硬化组	11.5 ± 1.8	15.25 ± 2.3	24.75 ± 3.0
脂肪肝组	14.5 ± 2.5	15.5 ± 2.5	28.0 ± 3.2
P 值	0.264	0.78	0.91

表 4 大鼠新生血管密度 TACE 治疗前后比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	2 周	TACE 治疗后	P 值
正常肝组	14.25 ± 2.2	26.5 ± 3.9	0.003
肝硬化组	15.25 ± 2.3	24.75 ± 3.0	0.04
脂肪肝组	15.5 ± 2.5	28.0 ± 3.2	0.001

表 5 大鼠新生血管密度随肿瘤生长时间前后比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	1 周	2 周	P 值
正常肝组	12.75 ± 1.9	14.25 ± 2.2	0.40
肝硬化组	11.5 ± 1.8	15.25 ± 2.3	0.06
脂肪肝组	14.5 ± 2.5	15.5 ± 2.5	0.64

密度,个/高倍镜



肿瘤微血管密度在治疗后明显上升(微血管被深染为褐色)

图 4 不同时间点肝脏切片镜下(100×)差异

3 讨论

本实验结果显示,肿瘤种植 1 周时肝硬化组平均体积最小,结果与 Li 等^[20-21]多位学者的研究结论相同,即肝硬化致密的肝实质会限制肿瘤的生长;肿瘤种植 2 周时肝硬化组平均体积最大,似乎大鼠的恶病质状态对肿瘤体积的影响力大于致密肝实质造成的影响;TACE 治疗后正常肝组平均体积最小,这可能与正常肝组大鼠相对于其他两组具有较好的免疫能力和肝功能有关;肝硬化组和脂肪肝组平均体积相似,结果与 Young 等^[22]的结论相同,即肝硬化和脂肪肝背景下的肝癌 TACE 治疗后疗效相似,但又与 Wu 等^[23]的结论有些出入,即肥胖患者 TACE 后效果较差。

正常组在 TACE 治疗后肝功能上升幅度在 3 组中最小,可能与较好的大鼠体质有关;肝硬化组和脂肪肝组,停止造模后肝硬化组指标回落幅度大,说明肝硬化对肝功能伤害更大,TACE 治疗后脂肪组指标上升幅度大,说明脂肪肝组依旧有较好的肝功能

储备。

微血管密度测量方法有很多种,有的直接数高倍镜下被 CD31^[24]或 CD34^[25]深染的微血管数量,有的方法则是计算被深染血管的面积与镜下视野面积的比值^[19]。从本实验结果看,不同的肝背景并不会对为血管密度有影响,随着肿瘤的生长也没有看见微血管密度有显著的增加。但栓塞会促进微血管的形成,且在 3 组中促进程度几乎相同。

本实验不足是整体实验大鼠动物模型样本量较少,可能会出现统计学偏差。

综上,肿瘤生长过程中:①肿瘤体积存在差异,肝硬化在前期会抑制肿瘤生长,但后期肝硬化大鼠的恶病质状态会加速肿瘤生长。②硬化组和脂肪肝组肝功能相似。③微血管密度未见明显差异,但随着肿瘤的增长微血管密度会稍增加。TACE 治疗后:①肿瘤体积未见明显差异。②脂肪肝大鼠相对于肝硬化大鼠有较多的肝功能储备。③微血管密度未见明显差异,但栓塞治疗会刺激微血管的增生。

[参 考 文 献]

- [1] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400:1345-1362.
- [2] Liu Z, Xu K, Jiang Y, et al. Global trend of aetiology-based primary liver cancer incidence from 1990 to 2030: a modelling study[J]. *Int J Epidemiol*, 2021, 50:128-142.
- [3] Cai XJ, Zheng Q, Jiang GY. Current status and prospect of surgical treatment of liver cancer[J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2019, 57:494-499.
- [4] 宗静静, 卿鑫, 樊哲, 等. 原发性肝癌治疗进展[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2021, 40:542-547.
- [5] Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11:7391-7400.
- [6] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U. S. adults[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348:1625-1638.
- [7] Foerster F, Gairing SJ, Müller L, et al. NAFLD-driven HCC: safety and efficacy of current and emerging treatment options[J]. *J Hepatol*, 2022, 76:446-457.
- [8] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases[J]. *Hepatology*, 2018, 67:328-357.
- [9] Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18:223-238.
- [10] Shah PA, Patil R, Harrison SA. NAFLD-related hepatocellular carcinoma: the growing challenge[J]. *Hepatology*, 2023, 77:323-338.
- [11] 宾文婷, 常加松, 吴剑平. 四氯化碳加乙醇复合法诱导肝硬化大鼠模型的建立及验证[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22:3224-3229.
- [12] 向贤宏, 李家平, 陈柳琴, 等. 大鼠肝硬化模型制备的改良[J]. *当代医学*, 2009, 15:729-731.
- [13] Xia HM, Wang J, Xie XJ, et al. Green tea polyphenols attenuate hepatic steatosis, and reduce insulin resistance and inflammation in high-fat diet-induced rats[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44:1523-1530.
- [14] Carbajo-Pescador S, Porras D, García-Mediavilla MV, et al. Beneficial effects of exercise on gut microbiota functionality and barrier integrity, and gut-liver crosstalk in an in vivo model of early obesity and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12:dmm039206.
- [15] 陈雯, 王静捷, 黄宇光. 用 Walker256 大鼠乳腺癌细胞建立大鼠胫骨瘤模型[J]. *协和医学杂志*, 2011, 2:350-356.
- [16] 江剑平, 江方璐, 李幼萍. 腹水 Walker256 乳腺癌细胞接种建立 SD 大鼠胫骨瘤模型[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 35:50-55.
- [17] 赵航, 郭思敏, 马中翔, 等. 大鼠胃十二指肠动脉逆行给药的研究[J]. *介入放射学杂志*, 2023, 32:456-458.
- [18] Liu J, Zhang L, Zhao DX, et al. Polymersome-stabilized doxorubicin-lipiodol emulsions for high-efficacy chemoembolization therapy[J]. *J Control Release*, 2022, 350:122-131.
- [19] Park W, Cho S, Ji J, et al. Development and validation of sorafenib-eluting microspheres to enhance therapeutic efficacy of transcatheter arterial chemoembolization in a rat model of hepatocellular carcinoma[J]. *Radiol Imaging Cancer*, 2021, 3:e200006.
- [20] Li T, Liu J, Wang Y, et al. Liver fibrosis promotes immunity escape but limits the size of liver tumor in a rat orthotopic transplantation model[J]. *Sci Rep*, 2021, 11:22846.
- [21] Jain A, Mazer B, Deng YH, et al. Hepatocellular carcinoma: does the background liver with or without cirrhosis matter? [J]. *Am J Clin Pathol*, 2022, 157:305-313.
- [22] Young S, Sanghvi T, Rubin N, et al. Transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: propensity score matching study comparing survival and complications in patients with nonalcoholic steatohepatitis versus other causes cirrhosis[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2020, 43:65-75.
- [23] Wu SE, Charles HW, Park JS, et al. Obesity conveys poor outcome in patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolization[J]. *Diagn Interv Imaging*, 2017, 98:37-42.
- [24] Wang Q, Zhang F, Lei Y, et al. MicroRNA-322/424 promotes liver fibrosis by regulating angiogenesis through targeting CUL2/HIF-1 α pathway[J]. *Life Sci*, 2021, 266:118819.
- [25] Lei HW, Huang BR, Cai J, et al. CXCR4 antagonist AMD3100 enhances therapeutic efficacy of transcatheter arterial chemoembolization in rats with hepatocellular carcinoma[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2022, 38:781-789.

(收稿日期:2024-03-25)

(本文编辑:茹实)