

康莱特注射液抗恶性肿瘤肝转移疗效及机制的实验研究

黄挺¹, 陈震², 杨雪飞¹, 李勇¹, 张志娣¹, 黄伶¹, 张建刚¹, 张晓丽¹ (1. 杭州市中医院, 杭州 310007; 2. 复旦大学附属肿瘤医院, 上海 200032)

摘要:目的 通过接种 W256 癌肉瘤建立 Wistar 大鼠肝癌转移模型, 观察康莱特注射液与肝动脉结扎法对大鼠荷瘤脾重与肝癌转移灶的抑制效果, 并测定其对瘤组织内基质金属蛋白酶 (MMP-1) 及肝细胞生长因子 (HGF) 表达的影响, 探讨中西医结合防治肝癌转移的新途径。方法 在 Wistar 大鼠脾下极注射 W256 癌肉瘤细胞悬液, 建立肝癌转移模型。随机分 4 组: 对照组、动脉结扎组、康莱特组、康莱特 + 动脉结扎组。计算各组瘤重抑制率与肝癌转移抑制率, 采用原位杂交技术检测肿瘤细胞内

作者简介: 黄挺, 男, 博士, 教授 E-mail: huangtin@sohu.com

MMP-1 和 HGF mRNA 表达水平。结果 康莱特和康莱特加动脉结扎组均显著抑制脾脏肿瘤生长并抑制肝脏瘤组织 MMP-1 mRNA 表达,康莱特组能明显抑制肝癌转移灶产生,各治疗组大鼠瘤细胞 HGF mRNA 表达水平均低于对照组。结论 康莱特注射液可显著抑制原发灶生长与肝癌转移灶的形成,抑制瘤细胞 MMP-1 表达是其抗肝转移的重要机制;康莱特注射液结合动脉结扎可使瘤细胞 MMP-1 表达减少,提示可优化两者结合途径。

关键词:康莱特注射液;肝动脉结扎法;肝转移;基质金属蛋白酶;肝细胞生长因子

中图分类号:R979.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)01-0012-04

Mechanism and Anti-liver Tumor Metastasis Activity of the Kang Lai Te Injection

HUANG Ting¹, CHEN Zhen², YANG Xue-fei¹, LI Yong¹, ZHANG Zhi-di¹, HUANG Lin¹, ZHANG Jian-gang¹, ZHANG Xiao-li¹ (1. Traditional Chinese Medicine Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310007, China; 2. Cancer Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the inhibiting effect of the Kang Lai Te Injection (KLT) and hepatic arterial ligation on rat's spleen transplantation tumor and the Liver Metastasis, and to test the inhibiting effect of this two methods on the expressions of the matrix metalloproteinase (MMP-1) and the hepatocyte growth factor (HGF) in rats' metastatic hepatoma. **METHODS** W₂₅₆ carcinosarcoma cells were injected into lower part of Wistar rats' spleen to set up a liver metastasis model, all rats were then randomly divided into four groups: KLT group, KLT plus ligation group, ligation group and control group. The inhibition ratios of the spleen tumor's weight and the liver metastasis were calculated. The mRNA expressions of the MMP-1 and the HGF in the tumor cell were observed by in-situ hybridization method. **RESULTS** Both the KLT group and the KLT plus ligation group can conspicuously inhibit the weight of spleen transplantation tumor and the mRNA expression of the MMP-1 in rats' metastatic hepatoma; The KLT group can also inhibit the formation rate of the liver metastasis; each group had a lower mRNA expression of the HGF comparing with the control group. **CONCLUSION** The KLT injection can inhibit both growth velocity of the spleen transplantation tumor and the liver Metastasis, lowering down the expression of the MMP-1, which may be an important suppressive mechanism of this drug. There is also a decreased expression of the MMP-1 in the KLT plus ligation group which indicated that the two methods combination should be optimized to get a satisfactory effect. **KEY WORDS:** Kang Lai Te Injection; hepatic arterial ligation; Liver metastasis; matrix metalloproteinase; hepatocyte growth factor

肝脏是各种肿瘤转移的好发部位,约占全部癌转移的 41.4%,因此预防和控制肝脏转移对于延长癌症患者的生存期,提高生活质量具有重要意义。与其他部位转移一样,肝癌转移的发生取决于肿瘤细胞在肝脏内的生长能力。已有研究发现肝细胞分泌的肝细胞生长因子(HGF)可刺激到达肝脏的瘤细胞生长;瘤细胞自身分泌基质金属蛋白酶(MMP)不仅溶解瘤细胞周围基质成分使瘤细胞穿透血管壁,而且可直接刺激瘤细胞生长。本实验将康莱特注射液与肝动脉结扎法应用于接种 W256 癌肉瘤大鼠,比较两种方法对大鼠荷瘤脾重及肝癌转移灶抑制效果的差别,同时观察其对瘤细胞内 MMP-1 和 HGF 等细胞因子表达的影响,寻找中药与手术治疗对肝癌转移治疗上的差异,为认识和评价康莱特注射液治疗肝癌转移提供理论及实验依据,以探讨中西医结合防治肝癌转移的新方法。

1 材料与方

1.1 材料

康莱特注射液:10 g/100 mL(杭州康莱特药业有限公司,批号 0406281-2);瘤株:W256 癌肉瘤(上海医药工业研究院);实验动物:SPF 级雌性 Wistar 大鼠(120±10)g[批号:SCXK(沪)2003-0003]饲养于复旦大学肿瘤医院动物房;HGF 及 MMP-1 原位杂交检测试剂盒(Boster 公司)。

中国现代应用药学杂志 2008 年 2 月第 25 卷第 1 期

1.2 方法

1.2.1 肝癌转移模型建立 造模前随机分为 4 组($n=10$):对照组、动脉结扎组、康莱特组、康莱特+动脉结扎组。W256 癌肉瘤细胞复苏后接种于大鼠腹腔,取瘤细胞快速增殖的腹水,生理盐水稀释至每毫升细胞数为 2×10^7 个的瘤细胞悬液。氯胺酮腹腔麻醉 Wistar 大鼠,沿左侧肋弓下缘切开腹壁,于脾下极注射瘤细胞悬液 0.1 mL。动脉结扎组、康莱特加动脉结扎组大鼠,同时结扎肝动脉左支。

康莱特组及康莱特加动脉结扎组大鼠每日腹腔注射康莱特注射液 1 mL,其他组大鼠注射等量生理盐水,连续给药 21 d。

1.2.2 计算瘤重抑制率与肝癌转移抑制率 大鼠脱颈椎处死,取脾脏和肝脏,称取脾脏瘤块重量,计数肝脏转移结节数。瘤重抑制率(%)=(对照组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$;肝癌转移抑制率(%)=(对照组平均克隆数-治疗组平均克隆数)/对照组平均克隆数 $\times 100\%$ 。计数肝癌转移克隆数时,单个转移灶直径 <0.3 cm 计为 1 个;0.3~0.5 cm 计为 2 个; >0.5 cm 计为 3 个。

1.2.3 肿瘤组织 HGF 及 MMP-1 表达测定 分离肝内瘤组织,制成低温冰冻切片。每张切片加 20 μ L 含地高辛标记探针的原位杂交液,湿盒内 40℃杂交过夜,干燥环境中继续杂

交 2 h后洗涤并封闭,滴加兔抗地高辛及生物素化羊抗兔 IgG, DAB显色,封片后镜下观察,计数阳性细胞数,以阳性细胞百分率加显色强度为标准^[1],判定阳性结果,阴性:阳性着色细胞≤15%,显色较浅;弱阳性:阳性细胞≤15%,显色较深;或>15%,显色较浅;强阳性:阳性细胞>15%显色深。

HGF寡核苷酸探针:采用三项寡核苷酸探针及长尾标记法:

探针序列(1)5'-GCAG GAGG AGAT GCAG GAGG ACAT GCTG CA-3';

探针序列(2)5'-TCCC AACG CTGA CATG GAAT TCCA TTCC AA-3';

探针序列(3)5'-GATG ATGC TGGC TGCA TTTC CTAT TTCC CA-3'。

MMP-1 寡核苷酸探针来源于人类基因(编号 NM002421 G1 4505214):

探针序列(1)5'-TGTC GAAG GGTC GCTG AGAT CTTT GTGT TC-3';

探针序列(2)5'-AGTT TCCC TTAT TCAT GACC CGAC AAGT CC-3';

探针序列(3)5'-TCTT TCGA TTAT CAGC CAAG TTGA CGTC CT-3'。

1.2.4 统计分析 各组数据统计均用 SPSS Version 10.0 完成,均数以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数比较用 *t* 检验;组间百分率比较作 χ^2 分析;分级资料用 Ridit 分析。统计显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 康莱特注射液对脾脏肿瘤生长的影响

康莱特加动脉结扎组和康莱特组脾脏肿瘤有明显的抑制作用,与对照组比较差异有显著性($P<0.01$),而单纯动脉结扎组大鼠脾脏肿瘤无明显缩小,见表 1。

表 1 康莱特注射液对脾脏肿瘤生长的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of Kang Lai Te injection on the growth of the spleen transplantation tumor($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	脾脏瘤重/g	抑瘤率/%	$P^{1)}$
康莱特组	1.44±0.30	40.25	<0.001
康莱特加动脉结扎组	1.58±0.40	34.44	<0.001
动脉结扎组	2.20±0.33	8.71	0.181
对照组	2.41±0.35		

注:¹⁾与对照组比较

Note:¹⁾ Compare with control group

2.2 康莱特注射液对肝癌转移灶的影响

康莱特组肝癌转移灶数平均为 7.3±2.30 个,相应的该组大鼠肝癌转移抑制率达 71.23%,与对照组比较差异显著($P<0.01$);单纯动脉结扎组与康莱特加动脉结扎组,大鼠肝癌转移抑制率相近,与对照组比较差异显著($P<0.05$),但均低于康莱特组,见表 2。

表 2 康莱特注射液对肝癌转移灶的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of Kang Lai Te injection on the formation rate of

the the liver metastasis($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	肝癌转移灶数	转移抑制率/%	$P^{1)}$
康莱特组	7.3±2.30	71.23	<0.001
康莱特加动脉结扎组	10.5±5.80	19.05	0.112
动脉结扎组	10.8±2.70	15.74	0.165
对照组	12.5±2.54		

注:¹⁾与对照组比较

Note:¹⁾ Compare with control group

2.3 脾脏瘤重与肝癌转移灶的关系

各治疗组抑制率高者,对应肝癌转移灶数目较少,反之亦然;进一步对肝癌转移灶数和脾脏瘤重作相关分析发现,脾脏瘤重与转移灶数目呈正相关,表明影响原发灶生长的因素同时能影响转移灶生长。

2.4 康莱特对肿瘤组织 MMP-1 mRNA 表达的影响

各治疗组大鼠肝肿瘤组织均有不同程度的 MMP-1 表达,其中动脉结扎组表达量与对照组相似,康莱特组 MMP-1 表达量明显减少,表明康莱特注射液可抑制肿瘤细胞表达 MMP-1。动脉结扎组 MMP-1 阳性率为 60%,与对照组比较差异无显著性,见表 3。

表 3 康莱特对肝癌转移灶瘤组织 MMP-1 mRNA 表达的影响($n=10$)

Tab 3 Effect of Kang Lai Te injection on mRNA expression of the MMP-1 in metastatic hepatoma($n=10$)

组别	MMP-1 mRNA 表达水平			$P^{1)}$
	阴性	弱阳性	阳性	
康莱特组	7	3	0	0.042
康莱特加动脉结扎组	8	2	0	0.035
动脉结扎组	4	3	3	0.769
对照组	3	4	3	

注:¹⁾与对照组比较

Note:¹⁾ Compare with control group

2.5 康莱特对肿瘤组织 HGF mRNA 表达的影响

对照组有 40%标本呈阳性着色,其他各组大鼠瘤细胞 HGF 均呈低表达,康莱特组表达水平最低,但与对照组比较无显著统计学差异,见表 4。

表 4 康莱特对肝癌转移灶瘤组织 HGF mRNA 表达的影响($n=10$)

Tab 4 Effect of Kang Lai Te injection on mRNA expression of the HGF in metastatic hepatoma($n=10$)

组别	HGF mRNA 表达水平			$P^{1)}$
	阴性	弱阳性	阳性	
康莱特组	8	0	2	0.146
康莱特加动脉结扎组	8	1	1	0.235
动脉结扎组	7	2	1	0.453
对照组	6	2	2	

注:¹⁾与对照组比较

Note:¹⁾ Compare with control group

3 讨论

癌症病人出现转移是癌症晚期的重要标志之一,也预示

着患者预后较差。对 9700 例癌症病人的尸检调查发现肝脏转移发生率仅次于淋巴转移 (57%), 居第二位。因此预防和控制肝脏转移不仅对于深入了解癌症的本质具有重要价值, 而且可显著提高癌症患者的生存率和生活质量。与其他部位转移一样, 肝癌转移的发生也是一个多步骤的连续过程: 瘤细胞从原发灶脱落进入血管, 随血液循环附着并穿透肝脏局部小血管壁, 在肝脏局部存活并生长为继发灶。转移过程中瘤细胞必须有效逃避免疫系统的攻击, 还需有新生血管“适时”地长入靶器官肿瘤灶内, 而单个瘤细胞进入靶器官组织间隙后的生长潜能则决定了该位置是否会发展为临床可见的转移灶^[2-3]。在现有条件下绝大部分小于 2 cm 的肿瘤是无法检出的, 远端转移灶在确诊癌症时就已存在, 因而失去了控制远端转移的最佳时机。抑制瘤细胞在转移灶内的生长是目前较为现实可行的手段。从中药薏苡仁中提取的有效成分康莱特注射液, 经临床实验证实具有提高机体免疫功能及抗癌双重作用, 能显著改善肝癌患者的临床症状, 延长生存期^[4-5]。本实验结果证实康莱特注射液能明显抑制脾脏肿瘤的生长, 抑瘤率达 40.25%, 与早先观察结果相一致; 该药肝癌转移抑制率为 71.23%, 提示可作为有效的肝癌转移抑制中药应用于临床。

肝细胞生长因子 (HGF) 是调节肝细胞生长的最重要细胞因子, 生理状况下肝细胞损伤即可刺激 HGF 表达, 促进肝细胞增殖。而原癌基因 *c-met* 的表达产物是 HGF 的受体, 对于表达 *c-met* 的肿瘤细胞而言, HGF 是强大的促运动剂, 能导致细胞间黏附力下降, 肿瘤细胞群落分散, 使肺、结肠、胃、胰腺、肝脏等处的肿瘤细胞骨架发生变化^[6-8], 运动能力增加, 更具有侵袭性。研究表明 HGF 与 MMPs 在促进肿瘤细胞转移方面有协同作用^[9]。在已知的 MMPs 中, MMP-1 的最适底物是纤维型胶原, 主要降解血管壁中的胶原成分, 肝血窦内皮间仅含极微量的纤维型胶原, 因此 MMP-1 高表达的细胞株更易于在肝脏形成转移灶。最近研究证实, 表达 MMP-1 的肿瘤细胞能溶解细胞外基质, 使其它细胞生长因子易于进入到肿瘤细胞周围, 刺激肿瘤细胞生长。实验中我们发现康莱特注射液能抑制转移灶瘤细胞 MMP-1 的表达 ($P < 0.05$), 康莱特组与康莱特加动脉结扎组 MMP-1 均为弱阴性, 表明抑制 MMP-1 表达是康莱特注射液抑制肝癌转移的机制之一, 并该药可与动脉结扎联合应用。本研究以动脉结扎模拟肝动脉栓塞治疗, 结果未见到该组大鼠肝癌转移灶中肿瘤细胞高表达 HGF, 可能与采用的瘤细胞株本身低表达

HGF 有关 (对照组动物标本阳性率仅 40%), 结合文献资料来看, 有些转移性肝癌经肝动脉栓塞术或肝部分切除诱发的血清 HGF 浓度上升, 主要是由宿主肝细胞分泌的^[10]。本研究发现康莱特注射液能抑制转移灶瘤细胞 HGF 表达, 康莱特组与康莱特加动脉结扎组 HGF 阳性表达率均低于对照组, 但无显著统计学差异, 这可能是由于本试验样本量过小, 尚不足以检出中药处理的差异, 有待今后继续研究证实。

REFERENCES

- [1] LU J P, YOSHITARO N. Non-radioactive hybridization technology (非放射性杂交技术) [M]. Haikou: Hainan Press, 1996: 97-99.
- [2] CHAMBERS A F, MACDONALD I C, SCHMIDT E E, *et al*. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1995, 14: 279-301.
- [3] KOOP S, SCHMIDT E E, MACDONALD I C, *et al*. Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11080-11084.
- [4] LI D P. The anticancer drug Kang-Lai-Te emulsion for infusion [J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2005, (9): 32-37.
- [5] WU L Q, LU Y, LU H J, *et al*. Efficacy of intra-tumor injection of Kang-Lai-Te in treating transplanted hepatoma in rats [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 3(4): 580-584.
- [6] YAMASHITA J, OGAWA M, NAKANO S, *et al*. High levels of hepatocyte growth factor/scatter factor in diffuse-type bronchioloalveolar cell carcinoma [J]. *Cancer*, 1998, 83: 2091-2098.
- [7] NABESHIMA K, SHIMAO Y, INOUE T, *et al*. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces not only scattering but also cohort migration of human colorectal adenocarcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 1998, 78: 750-759.
- [8] HAN S U, LEE J H, KIM W H, *et al*. Significant correlation between serum level of hepatocyte growth factor and progression of gastric carcinoma [J]. *World J Surg*, 1999, 23: 1176-1180.
- [9] KIEHNE K, HERZIG K H, FOLSCH U R. *c-met* expression in pancreatic cancer and effects of hepatocyte growth factor on pancreatic cancer cell growth [J]. *Pancreas*, 1997, 15: 35-40.
- [10] TOMIYA T, HAYASHI S, YANASE M, *et al*. Serum transforming growth factor- α level can be a parameter for evaluating liver regeneration after partial hepatectomy in patients with liver cancer [J]. *Semin Oncol*, 1997, 24(2): s6-14, s6-17.

收稿日期: 2007-09-14