

不同治疗方案对 H22 肝癌荷瘤小鼠的疗效比较

张园园, 方肇勤, 王艳明

(上海中医药大学 基础医学院, 上海 201203)

【摘要】 目的 比较不同治疗方案对 H22 肝癌荷瘤小鼠的疗效。**方法** 采用 H22 腋下实体瘤 KM 小鼠及小鼠标准化、计量化辨证方法, 观察复合化疗方案局部注射、索拉非尼口服, 及两者联合应用等对小鼠抑瘤率和证候的影响。**结果** 所选用 3 个治疗方案均具有一定的抑瘤作用, 综合对气血阴阳证候的影响及胸腺和脾脏重量, 以复合化疗方案局部注射联合索拉非尼口服最好。**结论** 局部介入联合索拉非尼口服方案疗效较好。

【关键词】 肝癌; 小鼠; 治疗方案; 疗效

【中图分类号】 Q95-33, R394.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 03-0067-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.014

Comparison of the curative effect of three therapeutic regimens on H22 hepatoma-bearing mice

ZHANG Yuan-yuan, FANG Zhao-qin, WANG Yan-ming

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China, 201203)

【Abstract】 Objective To compare the therapeutic effect of three treatment regimens on H22 tumor-bearing mice. **Methods** H22 tumor-bearing mice were treated by local injection of compound chemotherapeutic agents (5-FU, mitomycin and cisplatin), oral administration of sorafenib, or the both combined, respectively. Standardized and quantitative syndrome differentiation methods were used to assess the syndromes and tumor-inhibition rate in the mice. **Results** All these three therapeutic regimens were effective in suppressing the tumor growth in mice. Among them, the combined therapeutic regimen of local injection of compound chemotherapeutic drugs plus oral administration of sorafenib was the best. **Conclusion** The effect of sorafenib combined with local injection of compound chemotherapeutic agents is better than the other two regimens used separately.

【Key words】 Hepatocarcinoma; Mouse; Therapeutic regimens; Curative effect

肝癌是我国常见的恶性肿瘤, 西医多采用局部介入化疗、口服化疗药物等, 中医多采用辨证论治, 以中药复方为主; 而患者普遍寻求中西医结合治疗。为了探索、比较和优化中西医结合治疗方案, 我们尝试比较一些常用西医治疗方案的疗效, 以期获得疗效相对肯定、副作用小的治疗方案, 用于中西医结合研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 雄性小鼠 120 只, 体重 (25 ± 1) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2008-0003】; 实验在上海中医药大学动物实验中心进行【SYXK(沪)2009-0069】。

1.2 仪器及药物

四诊计量化检测设备见相关文献^[1-3]。局部介入用化疗药物: 5-Fu 75 mg、丝裂霉素 1.5 mg、顺铂 3 mg, 加入生理盐水至 60 mL, 配制成化疗药, 即每 0.2 mL 含有 5-Fu 0.25 mg、丝裂霉素 0.005 mg、顺铂 0.01 mg。灌胃药物: 索拉非尼 400 mg 加入蒸馏

[基金项目] 国家科技重大专项课题(课题编号: 2009ZX09502-018)。

[作者简介] 张园园(1982-), 女, 讲师, 博士。研究方向: 证候和辨证论治基础研究, E-mail: zhangyuan820929@sina.com。

水 100 mL, 配制成混悬液, 即每 0.5 mL 含有 2 mg 索拉非尼。

1.3 四诊计量化检测方法与计量辨证方法

(1) 采用课题组已建立的小鼠标准化四诊检测方法和计量辨证方法, 具体参见有关文献^[1-3]。

(2) 估算瘤体积 (cm^3) = $abb/2$ (a 代表体表测量肿瘤的长径, b 代表体表测量肿瘤的短径, 单位 cm)。

(3) 邪盛衰度 = 某荷瘤小鼠瘤体积/所有荷瘤小鼠瘤体积均数。

(4) 气盛衰度 = 某小鼠抓力/正常组小鼠抓力均数 $\times 0.5$ + 某小鼠水平跨格数/正常组小鼠水平跨格数均数 $\times 0.3$ + 某小鼠垂直站立次数/正常组小鼠垂直站立次数均数 $\times 0.2$ 。

(5) 阳盛衰度 = 某小鼠腋温/正常组小鼠腋温均数。

(6) 阴盛衰度 = 某小鼠去瘤体重/正常组小鼠体重均数。

(7) 血盛衰度 = 某小鼠爪 r/正常组小鼠爪 r 均数 $\times 0.7$ + 某小鼠尾 r/正常组小鼠尾 r 均数 $\times 0.3$ 。

(8) 抑瘤率 = (对照组平均瘤重 - 受试组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

1.4 造模、分组及处理

1.4.1 造模

随机取 20 只小鼠作正常对照组; 其余的腋下接种 H22 肿瘤腹水癌细胞 4×10^7 个/mL 0.2 mL, 出瘤后开展第一次四诊检测。

1.4.2 分组及处理

依据四诊检测结果, 分层随机分组到模型对照组, 以及化疗、灌胃、化疗加灌胃治疗组, 每组 20 只。

① 正常对照组 (正常组): 灌胃 0.5 mL 纯水。

② 模型对照组 (对照组): 肿瘤局部注射 0.2 mL 生理盐水, 灌胃 0.5 mL 纯水;

③ 局部介入化疗组 (化疗组): 肿瘤局部注射化疗药 0.2 mL, 由瘤体中心向四周注射。灌胃 0.5 mL 纯水; 化疗连续 5 d, 停止。

④ 西药灌胃组 (索拉组): 索拉非尼混悬液 0.5 mL 灌胃治疗; 肿瘤局部注射 0.2 mL 生理盐水。灌胃 11 d。

⑤ 局部介入化疗结合西药灌胃组 (化索组): 化疗局部介入治疗结合索拉非尼混悬液灌胃治疗。

1.5 疗效观察与评价

治疗同时, 每天记录动物死亡情况, 连续治疗 5 d、11 d 后, 开展第 2 次和第 3 次四诊检测, 由于部分小鼠的肿瘤出现破溃, 为避免溃烂引起的感染等

问题干扰实验结果, 故于第 12 天处死所有小鼠, 解剖, 称取肿瘤、脾脏、胸腺重量。分析治疗前后邪、气、阳、阴、血等盛衰度演变; 疗效采取各小鼠治疗后/治疗前检测值。

1.6 统计方法

采用 SPSS 15.0 统计软件包处理, 实验数据为计量资料用 ($m \pm sd$) 表示, 肿瘤、胸腺、脾脏重及治疗后/治疗前检测值组间比较采用单因素方差分析, 抑瘤率采用卡方检验, $P < 0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

2 结果

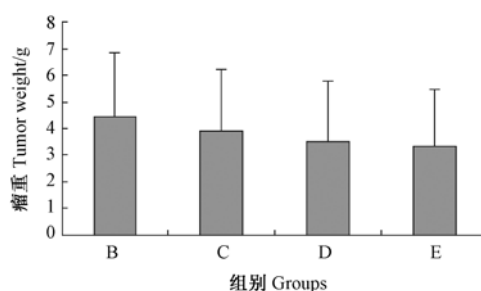
2.1 带瘤生存情况及抑瘤率

2.1.1 各组小鼠带瘤生存情况比较

该批荷瘤小鼠没有自然死亡者。

2.1.2 抑瘤情况

各治疗方案对肿瘤增殖均有一定的抑制趋势; 以局部介入化疗联合索拉非尼方案的抑瘤率最好, 局部介入化疗方案疗效稍弱 ($P < 0.05$)。参见图 1、2。



注: B, 对照组; C, 化疗组; D, 索拉非尼组; E, 化索组。下同

图 1 不同组别小鼠的瘤重

Note: B, Control group; C, Chemotherapy group; D, Sorafenib group; E, Chemotherapy & sorafenib group. The same as below

Fig. 1 Tumor weight of different groups

2.2 证候与演变

2.2.1 邪盛衰度

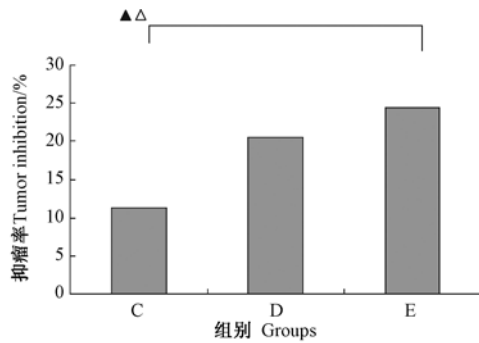
治疗后邪毒程度得到抑制。参见图 3、4。

2.2.2 气盛衰度

肿瘤邪毒伤气, 与正常组比较, 对照组和索拉组小鼠气虚程度加重 ($P < 0.05$), 化疗停药后, 化疗组和化索组小鼠元气出现部分恢复。参见图 5、6。

2.2.3 阳盛衰度

肿瘤邪毒伤阳, 各治疗方案有一定改善趋势。参见图 7、8。



注: ▲△化疗组与索拉组比较, $P < 0.05$ 。

图2 不同治疗方案的抑瘤率

Note: ▲△Chemotherapy group compared with chemotherapy & sorafenib group, $P < 0.05$.

Fig. 2 Tumor growth inhibition rate of different treatments

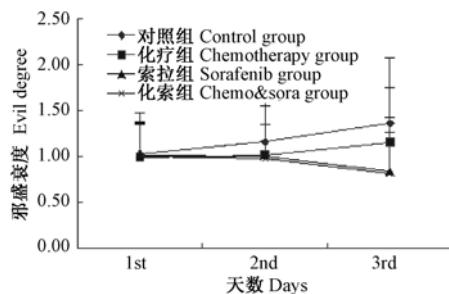


图3 不同组别小鼠肿瘤邪毒演变

Fig. 3 Evil degree of tumors in the mice of different groups

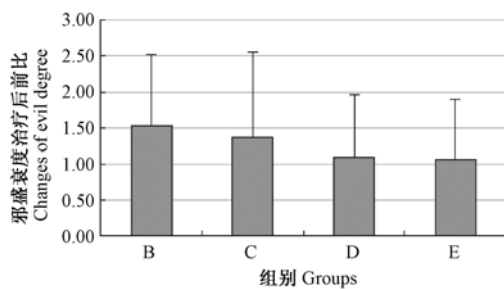


图4 不同组别小鼠治疗前后邪盛衰度比

Fig. 4 Changes of evil degree in different groups before and after therapy

2.2.4 阴盛衰度

肿瘤自然发展,小鼠会自发形成阴虚证,各治疗方案有加重伤阴趋势。其中,化疗组停药后有缓解趋势。参见图9、10。

2.2.5 血盛衰度

肿瘤邪毒有伤血趋势;对血虚程度的恢复,各治疗方案影响不大。参见图11、12。

2.3 脾脏指数和胸腺指数

2.3.1 脾脏指数

与正常组比较,肿瘤各组脾指数明显增大($P < 0.05$);治疗后各组均有减少趋势,以索拉组稍好。参见图13。

2.3.2 胸腺指数

与正常组比较,肿瘤各组胸腺指数明显减小($P < 0.05$);各治疗组有增大趋势,以化疗组稍好。参见图14。

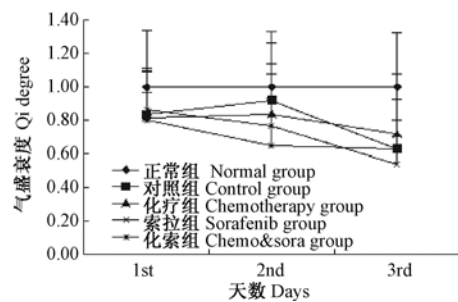
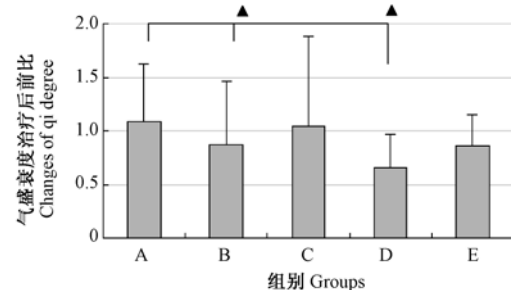


图5 不同组别小鼠气盛衰度演变图

Fig. 5 Qi degree of the mice in different groups



注:A,正常组。下同。▲ 与正常组比较, $P < 0.05$ 。

图6 不同组别小鼠治疗前后气盛衰度比较

Note: A, Normal group. The same as below hereinafter. ▲ Compared with the normal group, $P < 0.05$.

Fig. 6 Changes of qi degree in different groups before and after therapy

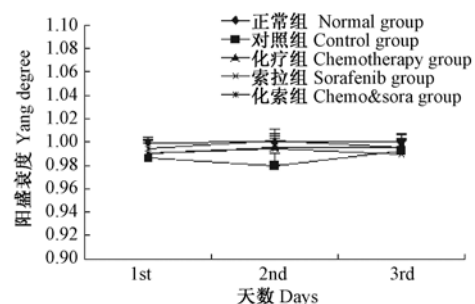


图7 不同组别小鼠阳盛衰度演变

Fig. 7 Yang degree of the mice in different groups

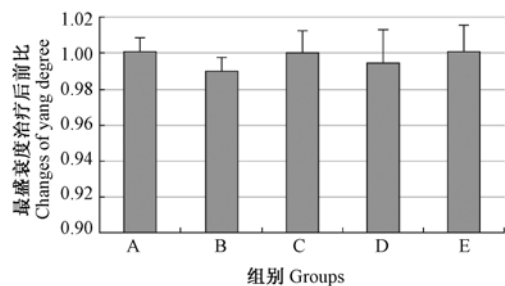


图 8 不同组别小鼠阳盛衰度治疗前后比较

Fig. 8 Changes of yang degree in different groups before and after therapy

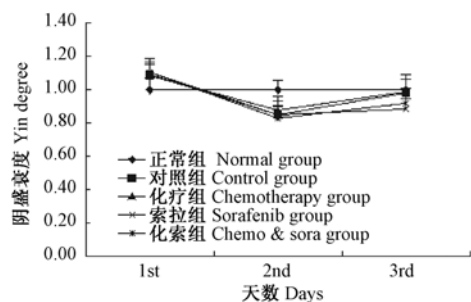


图 9 不同组别小鼠阴盛衰度演变

Fig. 9 Yin degree of the mice in different groups

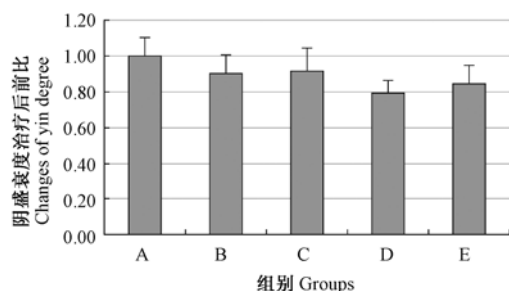


图 10 不同组别小鼠阴盛衰度治疗前后比较

Fig. 10 Changes of yin degree in different groups before and after therapy

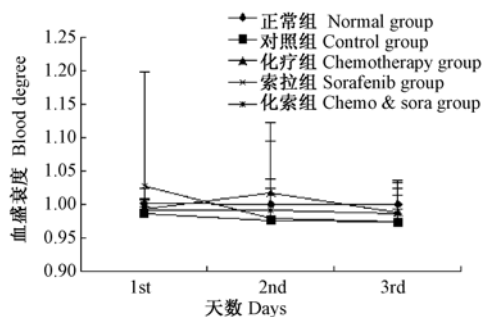


图 11 不同组别小鼠血盛衰度演变

Fig. 11 Blood degree of the mice in different groups

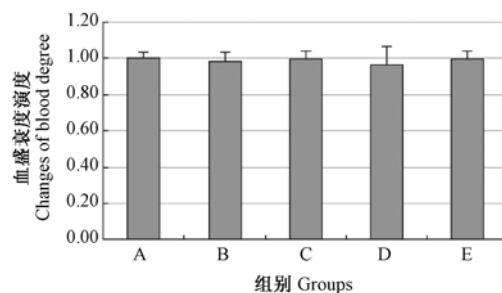
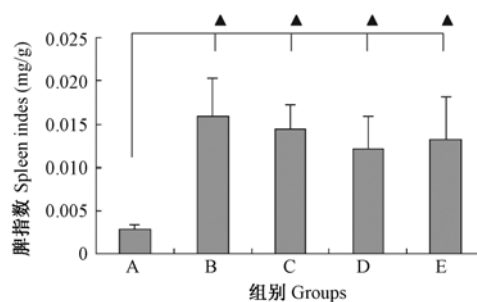


图 12 不同组别小鼠血盛衰度治疗前后比较

Fig. 12 Changes of blood degree in different groups before and after therapy

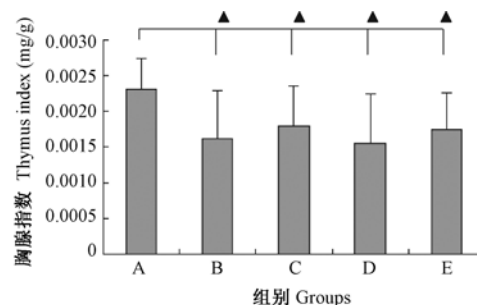


注: ▲ 与正常组比较, $P < 0.05$ 。

图 13 不同组别小鼠脾脏指数

Note: ▲ Compared with the normal group, $P < 0.05$.

Fig. 13 Spleen index of the mice in different groups



注: ▲ 与正常组比较, $P < 0.05$ 。

图 14 不同组别小鼠胸腺指数

Note: ▲ Compared with the normal group, $P < 0.05$.

Fig. 14 Thymus index of the mice in different groups

3 讨论

3.1 治疗方案选择的依据

分子靶向药物索拉非尼(商品名:多吉美),被认为是第一个可以显著延长晚期肝癌患者生存期的系统性治疗药物,在不同人种和不同地域的肝癌患者治疗中均显示生存获益^[4]。欧洲药品管理局(EMA)、美国药品监督局(FDA)和我国食品药品监督管理局(SFDA)相继批准了索拉非尼用于不能手术

的肝癌患者的治疗^[5]。血管介入化疗被认为是,能手术切除,但由于其他原因(例如高龄、严重肝硬化等)不能或不愿进行手术的患者以及不能手术切除的中晚期原发性肝癌患者的首选治疗方法^[6]。

氟尿嘧啶是细胞周期特异性药物,主要抑制 S 期细胞,是第一个用于原发性肝癌的系统性化疗药。丝裂霉素对肿瘤细胞的 G1 期、特别是晚 G1 期及早 S 期最敏感,在组织中经酶活化后,可与 DNA 发生交叉联结,抑制 DNA 合成,对 RNA 及蛋白合成也有一定的抑制作用。顺铂属是细胞周期非特异性药物,具有细胞毒性,可抑制癌细胞的 DNA 复制过程,并损伤其细胞膜上结构,属广谱有效抗癌药。三者联用,是目前肝癌的常用化疗方案之一。在中晚期原发性肝癌的血管介入化疗中,经导管肝动脉化疗栓塞术(TACE)与动脉灌注术(TAI)方法相似,都是在影像学技术的引导下,将化疗药物注入到肝动脉内,利用其毒性,“杀死”肿瘤细胞。不同的是,TACE 在局部化疗基础上使用了栓塞剂,叠加了栓塞肝动脉的作用,加速了局部肿瘤组织的坏死。国内多项研究报道,TACE 的疗效优于 TAI,但均存在样本量较小、观察周期较短等缺陷^[7,8]。有日本学者开展了一项多中心、随机、对照的Ⅲ期临床试验,比较 TACE 和 TAI 对 HCC 患者生存效果的影响。两组患者均以超选择方式经肝动脉注射净司他丁斯酯(SMANCS),根据肿瘤大小和分布调整注射剂量,最大剂量 6 mg(1 mg/mL),TACE 组在注射后放置明胶海绵栓塞^[9]。结果显示,与 TAI 组比较,TACE 并没有改善 HCC 患者的总体生存期。目前,关于 TAI 与 TACE 的疗效比较仍存在争议。另外,有研究报道 TACE 治疗后,因局部缺血、缺氧,使得一些促血管生长因子活化,促进了新生血管的形成,使得新生血管与其他肝内血管形成侧支循环,为肿瘤提供新的营养血供,从而增加了复发转移的机会^[10]。

血管介入化疗和分子靶向药物治疗,已成为现代医学治疗原发性肝癌的主要方法。为筛选最佳西医治疗方案,用于后续的中西医结合治疗,本批实验比较了肿瘤局部介入化疗、索拉非尼灌胃及两者联用 3 种治疗方案的优劣。肿瘤局部介入化疗,是将化疗药直接推注到小鼠肿瘤内,虽然给药途径与血管介入化疗存在一定差异,但治疗思路与之相符。主要是考虑到在小鼠身上开展血管介入治疗,存在着方法学的限制和技术操作方面的实际困难,故在实际操作过程中,未进行动脉插管。另外,由于肿瘤

组织中的血管十分丰富,注入肿瘤内的药物可以直接渗透入血,故作用效果与行动脉插管相似。因此,就动物实验层面而言,本研究采用的介入方法也是可行的。

3.2 不同治疗方案的疗效及副作用的比较

局部化疗介入治疗 5 d,对肝癌小鼠的邪毒程度有轻度抑制作用,但对小鼠的气、阴有一定的损伤,停药后,气、阴虚程度有所恢复。实验结束之际,其瘤重和脾脏重量较重,可能与停药多日,肿瘤恢复快速增长有关。索拉非尼治疗对邪毒程度有较好的抑制作用,但同样造成了肝癌小鼠的气、阴损伤。联合用药的抑瘤效果最好,对证候的影响与单用索拉非尼相似,在化疗停药后,小鼠气、阴虚程度的损伤有所减轻。上述结果显示,局部介入化疗和索拉非尼灌胃虽能抑制肿瘤增长,但对机体存在一定副作用,可造成气阴亏虚,影响小鼠生存质量,与肝癌临床治疗实际情况相似。

3.3 证候计量化疗效评价在临床前药效学实验中是必要的

以往肿瘤临床前动物实验研究多沿用西医的指标体系来衡量治疗的效果,忽略了所试验的治疗方案对证候疗效的影响。中医药辨证论治的疗效多体现在证候的改善,进行“证候疗效”评价,有利于正确判断辨证论治的真实疗效。

“证候疗效”指“证候改善程度”,即辨证论治治疗前后构成证候的症状、体征的变化程度,简而言之就是治疗前后(中医)症状体征的变化^[11]。目前,针对“证候疗效”尚无量化的评价标准,不利于对辨证论治的疗效做出准确、客观的评价。因此,在临床前动物实验中,引入证候计量化疗效评价思路是十分必要的。

本研究在借鉴现代医学的肿瘤疗效评价标准的同时,比较了治疗前后各组小鼠气、血、阴、阳以及邪毒证候的变化情况,对各治疗方案的证候疗效进行了量化评价的探索。不仅说明常用不同品系荷瘤小鼠与人类近似,会自发生成气血阴阳虚证及其兼证,证候会发生演变,是研究辨证论治的理想模式生物^[12];而且再次证明了课题组前期建立的标准化、计量化小鼠辨证方法^[1-3],可以准确地记录、刻画证候及其严重程度,可以用来客观化评价辨证论治以及中、西药的疗效和副作用。

(下转第 77 页)

物其他病原微生物的 RDB 方法的建立提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Fujiwara K. Tyzzer's disease [J]. Jap J Exp Med, 1978, 48: 467-480.
- [2] 姚菊芳. 某实验动物科技机构人员泰泽病原体感染血清学的调查 [J]. 上海实验动物科学, 1999, 19(4): 218.
- [3] Smith KJ, Skelton HG, Hilyard EJ. *Bacillus piliformis* infection in a patient infected with HIV-1: confirmation with 16S ribosomal RNA sequence analysis [J]. J Am Acad Dermatol, 1996, 34: 343-348.
- [4] Fujiwara K, Takagaki Y, Naiki M, et al. Tyzzer's disease in mice: effects of corticosteroids on the formation of liver lesions and the level of blood transaminases in experimentally infected animals [J]. Jpn J Exp Med, 1964, 34: 559-575.
- [5] 高正琴, 邢进, 王春玲, 等. 实验大鼠泰泽菌检测方法的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(3): 142-146.
- [6] Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28: 1942-1946.
- [7] Goto K, Itoh T. Detection of *Bacillus piliformis* by specific amplification of ribosomal sequences [J]. Exp Anim, 1994, 43(3): 389-394.
- [8] 赖国旗, 何明忠, 谭毅, 等. 小鼠肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的研究 [J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(6): 762-764.
- [9] 魏立雯, 韦莉, 张文露, 等. 反向线性探针杂交在检测试验动物沙门菌中的研究 [J]. 四川动物, 2013, 32(2): 195-198.
- [10] 韦莉, 魏立雯, 赖国旗, 等. 金黄色葡萄球菌反向线性杂交探针检测方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(6): 85-88.
- [11] 樊慧珍, 于化鹏, 黄少杰. 反向斑点杂交快速检测肺炎支原体 [J]. 实用医学杂志, 2005, 21(21): 2349-2351.
- [12] 赖国旗, 张文露, 胡源, 等. 反向线性探针杂交技术检测慢性乙型肝炎病毒拉米夫定耐药研究 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2012, 37(3): 113-119.
- [13] 赵丽, 张文露, 胡源, 等. 反向斑点杂交法快速检测 HBV 基因型反应条件的优化和建立 [J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12): 85-89.
- [14] 田永强, 朱中元, 王海波. 人乳头瘤病毒线性杂交分型技术的建立及评价 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 389-392.

[收稿日期] 2013-11-19

(上接第 71 页)

参 考 文 献

- [1] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 大鼠、小鼠常见证候计量化辨证方法的建立及其评价 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(7): 502-505.
- [2] 方肇勤. 大鼠/小鼠实验辨证论治方法学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 56-86.
- [3] 方肇勤. 辨证论治实验方法学——实验小鼠证法和辨证 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006, 45: 132-153.
- [4] Bruix J, Cheng A, Kang Y, et al. Effect of macroscopic vascular invasion (MVI), extrahepatic spread (EHS), and ECOG performance status (ECOGPS) on outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) treated with sorafenib: analysis of two phase, randomized, double-blind trials [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(15): 4580.
- [5] 张志明, 黎乐群, 刘剑勇, 等. 索拉非尼治疗晚期原发性肝癌的疗效和安全性分析 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(4): 352-354.
- [6] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会, 中华医学会肝病学会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治的专家共识 [J]. 临床肝胆病杂志, 2009, 25(2): 83-92.
- [7] 姜纯莲, 王广举, 李凤武. 中晚期肝癌及转移性肝癌灌注化疗、疗效观察 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2008, 11(8): 1160-1161.
- [8] 刘波, 刘乾贵, 越太迁, 等. 原发性肝癌介入化疗灌注与化疗栓塞疗效评价 [J]. 现代医药卫生, 2010, 26(16): 2469-2470.
- [9] Okusaka T, Kasugai H, Shioyama Y, et al. Transarterial chemotherapy alone versus transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized phase III trial [J]. J Hepatol, 2009, 51(6): 1030-1036.
- [10] Yu YQ, Xu DB, Zhou XD, et al. Experience with liver resection after hepatic arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2000, 71(1): 62-65.
- [11] 刘保延, 李洪蛟, 何丽云, 等. 证候疗效评价的研究进展 [J]. 中医杂志, 2009, 50(5): 397-399.
- [12] 方肇勤, 侯俐, 卢文丽, 等. 荷瘤小鼠证候的发生、演变、兼证及预后 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(1): 57-62.

[收稿日期] 2013-11-18