

· 论 著 ·

## 冬虫夏草经肿瘤滋养动脉插管注入对兔 VX2 肝癌模型的疗效研究\*

罗小平, 刘 曦, 曹闻挺, 邓 昊

(重庆医科大学附属第二医院放射介入中心 400010)

**摘要:**目的 评价冬虫夏草经肿瘤滋养动脉注入对兔 VX2 肝癌模型肿瘤组织生长抑制及肿瘤转移的影响。方法 将 40 只成功建立为 VX2 肝癌模型的大白兔随机均分成 A、B、C、D 4 组:超液态碘油组(A 组)、冬虫夏草组(B 组)、冬虫夏草加超液态碘油组(C 组)、生理盐水对照组(D 组)。每组模型在肿瘤移植后 14 d 进行肝动脉插管造影及相关药物超选择性肿瘤滋养动脉内注入,药物注入后 7 d 进行 CT 检查及病理学检查。结果 实验前 A、B、C、D 组肿瘤体积分别为(387.5±157.3)、(401.1±164.9)、(375.1±154.3)、(375.1±184.0)mm<sup>3</sup>,各组比较差异无统计学意义( $F=0.255, P=0.855$ );实验后各组肿瘤体积分别为(922.6±32.9)、(685.8±97.9)、(352.5±171.8)、(1403.5±409.2)mm<sup>3</sup>,各组比较差异有统计学意义( $F=26.13, P=0.030$ );各组肝内转移分别为:6、4、1、10 例( $P<0.05$ );腹腔淋巴结转移分别为:5、2、0、8 例( $P<0.05$ )。结论 冬虫夏草经肿瘤滋养动脉注入对兔 VX2 肝癌模型的肿瘤组织生长有抑制作用,能明显减少肿瘤肝内及远处转移的发生率。

**关键词:**兔 VX2 肝癌;冬虫夏草;滋养动脉;动物实验

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.31.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)31-3246-03

Study on the effect of transcatheter super-selective tumor-feeding intraarterial infusion of rabbit implanted VX2 hepatic tumor by cordyceps sinensis\*

Luo Xiaoping, Liu Xi, Cao Wenting, Deng Hao

(Department of Intervention Center, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the influence of growth inhibition and metastases of the hepatic tumor tissue of rabbit implanted VX2 hepatic tumor via transcatheter super-selective tumor feeding intraarterial infusion by cordyceps sinensis. **Methods** 40 rabbits bearing VX2 liver tumor were randomly divided into four groups and each group contained 10 rabbits: lipiodol group (group A), cordyceps sinensis (group B), cordyceps sinensis-lipiodol group (group C), normal saline group (group D). After implant 14 d, each group model underwent hepatic arterial digital subtraction angiography (DSA) and via transcatheter super-selective tumor-feeding intraarterial infusion, after 7 d of experimental study, spiral CT scan and histopathology examination were done. **Results** The tumor volumes before therapy (V1) were (387.5±157.3), (401.1±164.9), (375.1±154.3), (375.1±184.0)mm<sup>3</sup> respectively, without differences among them ( $F=0.255, P=0.855$ ). But the tumor volumes after TACE (V2) were (922.6±32.9), (685.8±97.9), (352.5±171.8), (1403.5±409.2)mm<sup>3</sup> respectively ( $F=26.13, P=0.0304$ ). Metastases in hepatic each group were found in 6, 4, 1, 10 cases ( $P<0.05$ ), celiac lymphonodus metastases in each were found in 5, 2, 0, 8 cases ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The cordyceps sinensis has effective treatment for the tumor tissue and its metastases with VX2 rabbit liver cancer via transcatheter super-selective tumor-feeding intraarterial infusion.

**Key words:** VX2 hepatic tumor; cordyceps sinensis; feeding artery; animal experimentation

经导管动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)作为肝癌非外科手术被国内外广泛采用,目前为非外科治疗的首选方法<sup>[1-2]</sup>,因药物疗效、肝癌的生物学特性等原因,TACE 疗效总难尽人意,改进其技术方法、获取最有效药物是 TACE 研究的重点。冬虫夏草被广泛应用于免疫、心血管、呼吸、泌尿生殖、消化、神经系统疾病的治疗而备受关注;文献报道,其对人乳腺癌、Balb-c 裸鼠非小细胞肺癌、小鼠 H22 肝癌等具有明显抑制作用<sup>[3-5]</sup>,可使肿瘤细胞凋亡,同时具有明显促进急性肝功能损害的恢复<sup>[6]</sup>,本实验拟通过兔 VX2 肝癌模型的肿瘤滋养动脉内灌注冬虫夏草提取物以研究其治疗价值。

## 1 方 法

**1.1 研究对象** 新西兰大白兔 40 只(重庆医科大学动物实验中心),许可证号:SCXK(渝)2007-0001。体质量 2.5~3.0 kg,

雌雄不限。VX2 肿瘤细胞株(重庆医科大学生物工程系),速眠新(沈阳军事医学科学院)。本研究严格遵守动物实验的各项伦理条例。按照文献<sup>[7]</sup>的方法建立兔 VX2 肝癌模型。

**1.2 设备与器材** 设备器材包括美国 GE 公司 LightSpeed 16 层螺旋 CT;日本岛津 1250MA DIGTEX PREMIER VC X 线机;日本泰尔茂公司 4Fcobra 导管、4F 导管鞘、2.7F PE 导管及 20G 动脉穿刺针。天然冬虫夏草(重庆医药公司中药材商店购);超液态碘油(法国 Guerbet)。

**1.3 实验动物分组** 40 只经 CT 扫描证肿瘤移植成功的 VX2 兔,按成组设计法随机平分分为 4 组,以肝动脉内注入物不同分为 A 组(超液态碘油),B 组(冬虫夏草提取液),C 组(冬虫夏草提取液+超液态碘油),D 组(生理盐水)。

**1.4 介入方法及术后处理**

**1.4.1 虫草提取液的制备** 10 g 天然虫草粉碎后以 90~95

\* 基金项目:重庆市医学科技计划项目(07-2-35)。

℃蒸馏水 50 mL 提取 3 h, 过滤、减压浓缩至约 1/3 量, 再以 90~95 ℃ 杀菌 30 min, -38 ℃ 冷冻干燥得提取物, 高效液相色谱法测定浓缩液中腺苷浓度, 浓度为 1 375.7 μg/L, 超过《中国药典》中对于虫草的质量控制标准。用生理盐水配制成相应浓度, NaOH 调节 pH 值为 7.2~7.4<sup>[8]</sup>。

**1.4.2 实验方法** 以速眠新 0.5 mg/kg 肌肉注射行麻醉, 剑突下纵行切开腹壁约 2.5 cm 并暴露肝脏, 分别以约 2 mm×2 mm×2 mm VX2 瘤组织 1 粒(取自荷瘤兔)埋入肝中叶约 3 mm 深处移植 2 个病灶, 间隔约 2 cm, 2 周后行 CT 平扫及增强, 参数为 120 kV, 200 mA, FOV 7.5 cm×7.5 cm, 层厚 5 mm; 碘海醇以 0.8 mL/s、总量 8 mL 注入。

以 5% 硫化钠液体于右腹股沟脱毛, 速眠新 0.5 mg/kg 肌肉注射麻醉, 仰卧固定于自制木板; 右侧腹股沟区消毒、铺巾, 于股动脉搏动最强处纵行切开皮肤约 3 mm, 以血管钳钝性游离股血管鞘, 直视下以 20 G 穿刺针与体表成角约 15~20° 沿髂动脉走行方向穿刺股动脉, 将 0.021 英寸超滑微导丝经穿刺针插入股动脉并达上腹区, 沿导丝插入 4F 导管鞘, 经鞘以 4F Cobra 导管插至腹主动脉上部前壁并插入腹腔干动脉后行 DSA 检查; 依据 DSA 显示作引导, 以 2.7F PE 微导管行同轴插管越过胃动脉等至肿瘤滋养动脉后再行 DSA 检查证实<sup>[4]</sup>; 经微导管分别注入超液态碘油(0.5 mL)、冬虫夏草提取液(0.5 mL)、冬虫夏草提取液(0.5 mL)+超液态碘油(0.5 mL)混悬液、生理盐水(0.5 mL), 并用 0.5 mL 生理盐水冲洗微导管以保证药物全部进入肿瘤血管; 以明胶海绵条块堵塞穿刺点周围后拔管并压迫止血约 15 min, 缝合、包扎切口; 以庆大霉素 4 万 U 及青霉素 80 万 U 肌肉注射(1 次/天, 连续 3 d), 单笼饲养、加强清洁等护理。仅将术后生存满 7 d 并获得病理标本者成组。

**1.5 肿瘤增长率检测** 实施介入后 7 d 按上述方法再分别行 CT 扫描, 计算肿瘤体积 V2, 并计算肿瘤增长率=(V2-V1)/V1%。测量肿瘤最大直径 d1 及与之成垂直方向的最小直径 d2, 利用公式  $V1 = d1 \times d2^2 / 2$  计算肿瘤体积 V1。

**1.6 病理学检测** 实验后 7 d 行 CT 检查并处死实验兔, 取肿瘤及周围 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 肝组织, 以 10% 甲醛固定、石蜡包埋, 5 μm 连续切片, 行 HE 染色, 以 200 倍光学显微镜观察, 重点为细胞坏死、细胞核碎裂。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 各实验组间的比较用单因素方差分析, 多组的两两间比较用 LSD 法检验, 两组间比较用成组 t 检验, 对方差不齐者用秩和检验, 血管内皮生长因子(VEGF)表达与微血管密度(MVD)值比较采用双变量相关分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 实验兔结果** 本研究共实施兔肝 VX2 肿瘤移植 51 只, 术中无死亡, 移植后 14 d 内因感染等因素死亡 11 只, 进行实验研究者 40 只。

**2.2 CT 及 DSA 检查结果** 介入治疗前 CT 表现: 平扫见肿瘤病灶呈类圆形低密度结节影, 边界欠清晰, 密度较均匀, 中心见更低密度区; 增强示病灶动脉期边缘环状强化、中心区无强化 35 只(图 1A), 病灶全部强化 5 只; 门脉期、延迟期病灶无强化、边缘清晰。肝动脉 DSA 表现: 肿瘤周边血管增粗、扭曲、紊乱, 病变中心血管相对较少; 1 支及 1 支以上肿瘤滋养动脉分别为 14、26 只, A、B、C、D 组均成功进行超选择性插管(图 1B、C)。术后 7 d CT 表现: A 组 18 个病灶, C 组 20 个病灶区周边大量碘油沉积、中心碘油沉积较少(图 1D); 术后各组病灶体

积、肝内及腹腔内转移、腹水等表现见表 1。

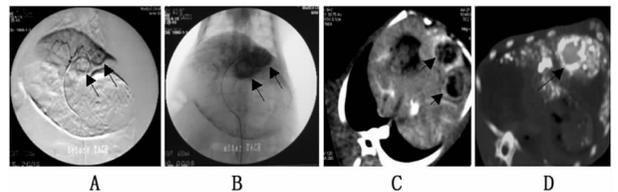
**表 1 术后 7 d 病灶大体病理结果(n)**

组别	n	病灶数目	各病灶体积变化			肝内转移		腹腔内转移		腹水	
			增大	无变化	缩小	少量广泛	局限	广泛	少	多	
A 组	10	18	13	5	0	5	1	4	1	4	2
B 组	10	18	4	8	6	4	0	2	0	3	0
C 组	10	20	3	5	12	1	0	0	0	1	0
D 组	10	19	19	0	0	4	6	2	6	3	7

**2.3 肿瘤增长率比较结果** 实验前 A、B、C、D 组肿瘤体积分别为(387.5±157.3)、(401.1±164.9)、(375.1±154.3)、(375.1±184.0)mm<sup>3</sup>, 各组比较差异无统计学意义(F=0.255, P=0.855); 实验后各组肿瘤体积分别为(922.6±32.9)、(685.8±97.9)、(352.5±171.8)、(1 403.5±409.2)mm<sup>3</sup>, 各组比较差异有统计学意义(F=26.13, P=0.030)。4 组肿瘤增长倍数分别为 1.9、0.85、-0.05、2.6 倍。

**表 2 术后各个肿瘤坏死结果(n)**

组别	病灶数	坏死范围			坏死程度			肿瘤血管数	
		少	中度	广泛	轻度	中度	完全	减少	闭塞
A 组	18	10	8	0	13	5	0	0	0
B 组	18	1	12	5	4	10	4	14	4
C 组	20	0	9	11	2	12	6	13	7
D 组	19	19	0	0	19	0	0	0	0



**图 1 实验兔病灶 CT 及 DSA 表现**  
A: 实验兔术前 CT 增强所见 2 个移植病灶(黑箭头)。B: 2.7F 微导管超选择性插管至图 1A 所示病灶滋养动脉后造影所见(黑箭头)。C: 注入碘油后上述病灶内碘油沉积改变与图 1A、B 表现类似(黑箭头)。D: 实验后 7 d CT 检查见病灶内碘油沉积为环状(黑箭头)。

**2.4 病理结果** 所有获取的病理组织采用 HE 染色、200 倍光镜观察: 介入治疗前可见癌细胞大小、形态不一, 排列紊乱, 细胞核大, 深染, 核浆比例增大, 呈浸润型生长, 肿瘤中心可见黄白色凝固性坏死。介入治疗组术后肿瘤大部分呈凝固性坏死, 边缘成熟血管萎缩、闭塞、消失, 残留少许不成熟的血管内皮细胞。A 组见部分细胞核碎裂, 细胞结构基本完整, 细胞间界限清晰(封 2 图 2A)。B 组多数肿瘤细胞核碎裂、体积缩小, 细胞间界限模糊、间隙加大提示肿瘤细胞部分坏死(封 2 图 2B)。C 组细胞体积明显缩小、细胞核碎裂、分界模糊, 细胞大体结构不能分辨, 细胞间间隙明显增加提示细胞基本坏死(封 2 图 2C)。D 组肿瘤细胞整体完整, 细胞核结构、边界清晰, 未见坏死征象(封 2 图 2D)。术后病灶显微病理改变见表 2。

**3 讨 论**

VX2 肿瘤为 Shope 病毒注入兔皮内诱发的鳞癌, 通过反复传代后成为兔可移植性肿瘤, 在肝脏移植成功率高, 其生长、浸润、转移等生物学特性相似人类原发性肝癌, 因此, 兔 VX2

肝癌模型被广泛作为肝癌药物、新技术研究的经典实验模型<sup>[5]</sup>。

在经兔肝动脉插管实验研究时,因肝动脉细小、迂曲,4F 导管仅能插管至腹腔干动脉,无法插入细小的肿瘤滋养动脉注入药物,致使实验不准确、实验兔死亡率高;文献显示众多实验研究采用剖腹肝动脉插管或经股动脉穿刺肝固有动脉注入药物<sup>[6-7]</sup>,而本研究均采用 2.7F PE 超滑微导管超选择性行病变滋养动脉插管注入药物,使药物更为准确注入病变区、且减少甚至避免非肿瘤肝组织损害(图 1B、C),这与目前临床原发性肝癌 TACE 治疗普遍主张采用超选择性插管栓塞相一致<sup>[8-9]</sup>,本实验研究发现采用该技术方法后实验兔意外死亡率较低。

国内外学者实验研究显示冬虫夏草除可提高机体免疫力外,其对乳腺癌、肺癌、前列腺癌等均有明显治疗作用<sup>[3,10-12]</sup>,以其治疗肝癌,尤其是经肝癌肿瘤滋养动脉直接注入的治疗作用研究较少报道,原发性肝癌病灶均主要接受肝动脉供血且为富血供肿瘤为学术界所公认<sup>[13]</sup>,本课题以其提取液经肿瘤滋养动脉注入可明显提高肿瘤局部药物浓度增强疗效。

本研究显示,单纯冬虫夏草提取液即可以明显抑制肿瘤病灶生长、生长减慢,促使肿瘤细胞坏死、肿瘤局部滋养动脉减少(图 2A),同时降低肿瘤肝内及腹腔转移发生概率,其作用机制尚不清楚,研究结果表明冬虫夏草可以抑制肿瘤生长、转移,明显提高实验兔的存活率,不仅与其抑制肿瘤生长有关,张小强等<sup>[14]</sup>研究表明其对肝急性化学性损伤具有保护作用,也可能同时具有保护肝功能进而提高实验兔生存率密切相关。

徐辉等<sup>[15]</sup>报道,肝癌在 TACE 术后血管内皮生长因子(VEGF)等血管生长因子可促使血管新生,进而促使残存肿瘤快速生长、转移,本实验显示冬虫夏草除促使肿瘤坏死、缩小之外,术后局部肿瘤滋养动脉有减少、甚至有闭塞改变(表 2),因此,其可能具有抑制肿瘤血管新生的作用,有待在进一步的实验研究中予以证实。

实验显示冬虫夏草提取液混合碘油后,对于抑制肿瘤生长、转移,以及提高生存率方面明显优于单纯提取液组(图 2A、B),这和其与混合碘油后,冬虫夏草抗肿瘤成分高浓度、长时间作用于肿瘤组织密切相关。临床肝癌 TACE 治疗中,碘油与化疗药物混合可显著提高治疗局部肝癌的疗效,也间接证实了 C 组疗效优于 B 组的结果(图 2)。

研究同时显示,单纯碘油注入肿瘤滋养动脉后,虽然部分病例未增大,但肿瘤血管无减少、闭塞表现,这与碘油进入肿瘤滋养动脉后,其细小油珠进入肿瘤毛细血管床,可以减少肿瘤血液供应,继而部分抑制肿瘤生长,但其并不能使局部肿瘤明显坏死。

综上所述,冬虫夏草经肿瘤滋养动脉注入对兔 VX2 肝癌模型的肿瘤组织生长有抑制作用,能明显减少肿瘤肝内及远处转移的发生率,抑制局部肿瘤滋养血管的生长,尤其是与碘油混合后,因局部长时间高浓度的药物作用可以明显提高治疗效果,对于该结果是否适于人类肝癌治疗,有待进一步研究证实。

#### 参考文献:

[1] Kim JH, Kim JH, Choi JH, et al. Value of the model for

end-stage liver disease for predicting survival in hepatocellular carcinoma patients treated with transarterial chemoembolization[J]. Scand J Gastroenterol, 2009, 44(3): 346-357.

- [2] Miyayama S, Mitsui T, Zen Y, et al. Histopathological findings after ultraselective transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res, 2009, 39(4): 374-381.
- [3] 刘东颖, 谢广茹, 史玉荣, 等. 冬虫夏草对乳腺癌细胞凋亡的诱导及相关基因表达的调控[J]. 天津医科大学学报, 2007, 13(2): 206-209.
- [4] Yoo HS, Shin JW, Cho JH, et al. Effects of Cordyceps militaris extract on angiogenesis and tumor growth[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(5): 657-665.
- [5] Liang XM, Tang GY, Cheng YS, et al. Evaluation of a rabbit rectal VX2 carcinoma model using computed tomography and magnetic resonance imaging[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(17): 2139-2144.
- [6] 鲁东, 吕维富, 高斌, 等. 兔 VX2 肝癌肝动脉栓塞术后肿瘤新生血管的变化与分析[J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7(3): 305-308.
- [7] 钟灵, 俞志坚, 慕革非, 等. 兔 VX2 肝癌模型的肝动脉插管技术改良及 DSA 表现[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(12): 1803-1805.
- [8] Ye SL. Expert consensus on standardization of the management of primary liver cancer[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2009, 17(6): 403-410.
- [9] 罗小平, 谢微波, 何明菊, 等. 小肝癌肿瘤滋养动脉超选择性无水乙醇栓塞治疗的临床价值(附 95 例报告)[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(7): 951-954.
- [10] 孙艳, 孙艳影, 杜凤霞. 冬虫夏草精粉抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(10): 2172-2173.
- [11] 陈晓燕. 冬虫夏草的药理与临床研究进展[J]. 中药导报, 2009, 15(2): 91-92.
- [12] 徐晋, 傅雷, 姚乐申. 冬虫夏草合用顺铂诱导非小细胞肺癌凋亡的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(6): 398-400.
- [13] 牛焕章, 滕皋军, 邓钢, 等. 兔 VX2 肝癌模型的影像学表现和栓塞技术的实验研究[J]. 中国医学影像技术, 2006, 22(6): 797-800.
- [14] 张小强, 浦跃朴, 尹立红, 等. 冬虫夏草及人工虫草菌丝体对 CC14 所致急性化学性肝损伤的保护作用[J]. 环境与职业医学, 2003, 20(6): 422-426.
- [15] 徐辉, 王滨, 高志芹, 等. 肝动脉化疗栓塞术后残癌组织血管内皮生长因子表达的研究[J]. 临床放射学杂志, 2004, 23(12): 620-622.

(收稿日期: 2012-06-10 修回日期: 2012-08-13)