

· 论 著 ·

模拟介入围手术期 IFN- $\alpha$  联合 ATRA 治疗肝癌的效果观察\*赵书元<sup>1</sup>, 吴李鸣<sup>2</sup>

(1. 河南省驻马店市中心医院放射科 463000; 2. 浙江大学医学院附属第一医院肝胆胰外科, 杭州 310003)

**摘要:**目的 探讨介入围手术期干扰素- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )联合全反式维甲酸(ATRA)治疗肝细胞癌的疗效。方法 选取 28 只 Wistar 大鼠,建立肝癌细胞 CBRH7919 的动物模型,并将瘤块组织移植于大鼠体内。1 个月后,待瘤块完全形成后将所有大鼠的肝动脉进行结扎,并将所有大鼠随机分为实验组与对照组,各 14 只。对照组给予腹腔注射生理盐水,实验组给予腹腔注射 IFN- $\alpha$  联合 ATRA 进行治疗。10 d 后将所有大鼠处死,并检测肝癌组织中血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)mRNA 及蛋白的表达水平、癌细胞的凋亡情况与瘤体内的微血管密度。结果 实验组外周血 VEGF 水平、肿瘤微血管密度及肿瘤细胞凋亡指数[(91.8 $\pm$ 12.7) pg/mL, (115.7 $\pm$ 11.8) 个/HP, (12.29 $\pm$ 4.53)%]均明显低于对照组[(67.4 $\pm$ 18.3) pg/mL, (65.3 $\pm$ 7.2) 个/HP, (3.81 $\pm$ 1.52)%],差异有统计学意义( $P < 0.05$ );逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组织化学法检测的结果均显示,实验组 bFGF 及 VEGF 表达要明显低于对照组。结论 围介入手术期 IFN- $\alpha$  联合 ATRA 的使用能够抑制新生肿瘤血管的生成,提高介入手术的临床疗效,值得推广。

**关键词:**肝肿瘤;干扰素 $\alpha$ ;全反式维甲酸;介入围手术期

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.21.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)21-2449-03

Observation of effect of IFN- $\alpha$  combined with ATRA in liver cancer therapy in perioperative phase of intervention\*Zhao Shuyuan<sup>1</sup>, Wu Liming<sup>2</sup>

(1. Department of Radiology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan 463000; 2. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the First Affiliated Hospital of the Medical School of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310003)

**Abstract:** Objective To study the effect of IFN- $\alpha$  combined with ATRA in liver cancer therapy in perioperative phase of intervention. Methods An animal model of liver cancer CBRH7919 was established by implanting 28 Wistar rats with tumor tissue. The hepatic artery was tied off in one month after formation of tumor. All the rats were randomly divided into the experimental group (14 cases) and the control group (14 cases). The control group accepted peritoneal injection with normal saline while the experimental group accepted IFN- $\alpha$  combined with ATRA. 10 days later, all the rats were sacrificed. And the level of expression of VEGF, bFGF, microvessel density, and apoptotic index of tumor cells were measured. Results Serum VEGF level, MVD and apoptotic index of tumor cells of the experimental group were statistically lower than that of the control group [(91.8 $\pm$ 12.7) pg/mL, (115.7 $\pm$ 11.8)/HP, (12.29 $\pm$ 4.53)% vs. (67.4 $\pm$ 18.3) pg/mL, (65.3 $\pm$ 7.2)/HP, (3.81 $\pm$ 1.52)%,  $t = 4.099, 13.642, 6.640, P < 0.05$ ], results of RT-PCR and immunohistochemistry detection both showed that the levels of expression of VEGF and bFGF of the experimental group was lower than that of the control group. Conclusion IFN- $\alpha$  combined with ATRA in liver cancer therapy in perioperative phase of intervention could suppress the generation of neoplastic vascular and improve the effect of the intervention. So it is worth promoting.

**Key words:** liver Neoplasms; interferon-alpha; ATRA; perioperative intervention

中国的原发性肝癌病例约占全世界病例的 42.5%,且一半以上的患者合并有不同程度的肝硬化与乙型肝炎<sup>[1]</sup>。对于失去外科手术机会的患者,临床上常对其使用肝动脉化疗栓塞术(TACE)进行治疗,近年来 TACE 得到了广泛的普及,明显改善患者的预后,提高了患者的生活质量<sup>[2-3]</sup>。但单纯的化疗栓塞术常常无法达到最佳的治疗效果,残存的肝癌细胞造成了后期的转移与复发,影响了整个治疗的远期效果。全反式维甲酸是维生素 A 的衍生物,也是一类十分重要的诱导分化剂,实验表明其能够使得 P53 与 Fas 等癌细胞凋亡相关基因的表达增高,并对 Bcl-2 形成抑制作用<sup>[4]</sup>。而干扰素- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )对于恶性肿瘤在体内的复发与转移也有着一定的抑制作用,本研究

探讨介入围手术期 IFN- $\alpha$  联合全反式维甲酸(ATRA)治疗肝细胞癌的疗效,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 选取 2 只 5 周龄的 BALB/c 雄性裸小鼠[中国医学科学院实验动物研究所提供,合格证编号:SCXY(京)-2012-0004],在 IVC 环境中对其进行饲养,所有饲料与饮水均无菌,饲养环境无病原体。将肝癌细胞 CBRH7919 的细胞悬液接种于裸鼠皮下,每只所接种的细胞数为  $1 \times 10^7$ 。14 d 后,将接种肝癌细胞的裸鼠处死,取出瘤体组织。将瘤体切成宽厚分别为 2、2、1 mm 的小瘤块,并接种于 28 只 Wistar 大鼠(购自复旦大学医学院实验动物科学部)。将所有 Wistar 大鼠按随机

数法随机分为实验组与对照组,各 14 只。实验组雄、雌各 7 只,平均(182.9±37.2)g;对照组雄、雌各 7 只,平均(183.7±36.6)g。两组大鼠的性别及体质量差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

**1.2 方法** 大鼠在接受瘤体移植 1 个月后,将所有大鼠的肝动脉进行结扎。实验组接受 IFN- $\alpha$ (1 000 U/g,2 日/次)与 ATRA(0.02 mg/g,1 日/次)腹腔注射,对照组接受相同剂量的生理盐水腹腔注射。10 d 后,取大鼠的下腔静脉血 1 mL,于 37 °C 的环境下放置 5 h,将标本放入离心机进行离心 5 min(3 000 r/min),分离血清后将其放置于-80 °C 的冰箱中保存。将所有 Wistar 大鼠处死,分离肿瘤组织,将标本放置于-80 °C 的冰箱中保存。测定血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的 mRNA 的表达水平时,将肿瘤组织取出,称质量,将液氮加入研钵,在将标本磨匀后加入 1 mL TR-Izol,混匀后加入到 Eppendorf 管中并加入氯仿,振荡混匀后放入离心机离心 15 min(4 °C,12 000 r/min)。吸取上清液后将其置于另一个 Eppendorf 管,加入相同体积的异丙醇后混匀,再次离心 10 min(4 °C,12 000 r/min)。离心后将上清液吸除,将浓度为 75% 的乙醇加入以对剩余的沉淀物进行清洗,离心后将后加入的乙醇弃除。待沉淀干燥后加入 DEPC 水,形成 RNA 溶液,采用核酸-蛋白检测仪检测 RNA 浓度,并配置琼脂凝胶电泳对 RNA 的完整性进行验证。VEGF 与 bFGF 蛋白的表达水平及肿瘤微血管密度采用免疫组织化学法进行检测,外周血的 VEGF 水平采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测,肿瘤细胞的凋亡指数采取流式细胞仪及 TUNEL 进行检测。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组数据间计量资料使用两独立样本  $t$  检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

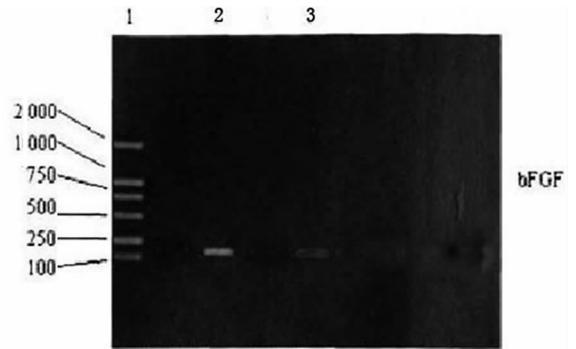
**2.1 两组 VEGF 水平、肿瘤微血管密度及肿瘤细胞凋亡指数比较** 实验组 VEGF 水平、肿瘤微血管密度及肿瘤细胞凋亡指数均明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

**2.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 bFGF 及 VEGF mRNA 表达水平情况比较** 实验组 RT-PCR 检测的 bFGF 及 VEGF mRNA 表达水平要明显少于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1、2。

**2.3 两组免疫组织化学法检测的 bFGF 及 VEGF 蛋白表达比较** 实验组与对照组免疫组织化学法检测的 bFGF 及 VEGF 蛋白表达结果与 RT-PCR 检测的结果一致,实验组上述两种蛋白的表达均低于对照组,见图 3。

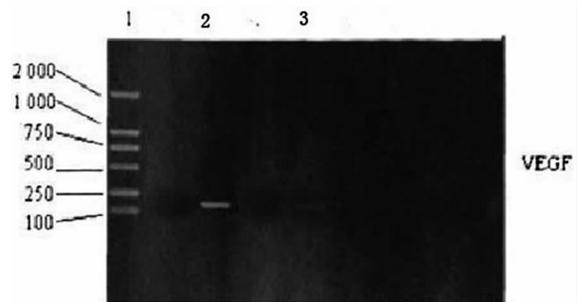
表 1 两组 VEGF 水平、肿瘤微血管密度及肿瘤细胞凋亡指数比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	VEGF (pg/mL)	肿瘤微血管 密度(个/HP)	肿瘤细胞 凋亡指数(%)
实验组	14	91.8±12.7	115.7±11.8	12.29±4.53
对照组	14	67.4±18.3	65.3±7.2	3.81±1.52
<i>t</i>		4.099	13.642	6.640
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000



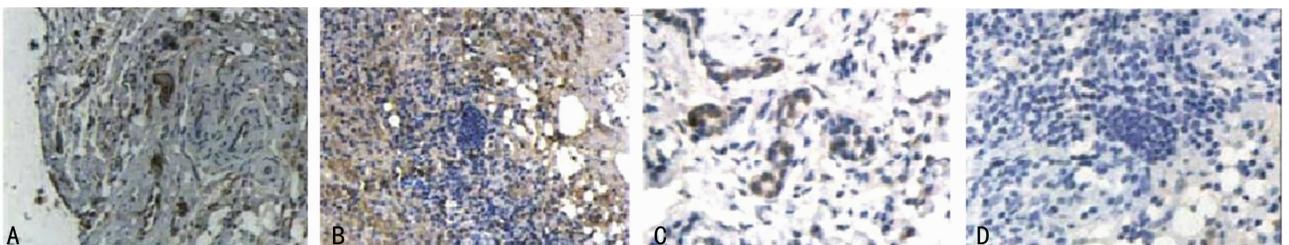
1: 标记物;2: 对照组;3: 实验组。

图 1 两组 RT-PCR 检测 bFGF mRNA 的表达情况



1: 标记物;2: 对照组;3: 实验组。

图 2 两组 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 的表达情况



A: 对照组 bFGF; B: 实验组 bFGF; C: 对照组 VEGF; D: 实验组 VEGF。

图 3 免疫组织化学法检测的 bFGF 及 VEGF 蛋白表达

## 3 讨论

原发性肝细胞癌的病情进展快且隐匿性强,临床上手术切除率不足 1/3, TACE 的出现使得无法手术的患者获得了一种新的治疗机会<sup>[5-6]</sup>。但通过对肝癌患者术后的病情进行监测,

许多学者都发现患者体内的癌基因 Bcl-2 的表达在术后发生上调,其对肝细胞的诱导程度增强,患者的远期预后也因此受到影响。TACE 术后虽然肿瘤的部分血管被栓塞,但肿瘤在缺氧的情况下生成了较多的侧支循环,残留的癌细胞造成了癌

症的复发与转移<sup>[7]</sup>。

VEGF 与 bFGF 是恶性肿瘤细胞所分泌的数十种生长因子中作用最为重要的两种因子,其诱发了内皮细胞的增殖与迁移<sup>[8]</sup>。VEGF 在乳腺癌、肺癌、大肠癌及胃癌等恶性肿瘤中的表达与肿瘤微血管的密度关系紧密,且对于患者的远期预后有着一定的预测价值。本研究结果显示,实验组 VEGF 与 bFGF 的表达要显著低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。肿瘤内部微血管的生成过程十分复杂,主要包括细胞外基质与基底膜发生降解,细胞外基质的增殖,新生血管腔的形成并相互吻合成网<sup>[9]</sup>。在整个过程中,血管生成因子与抑制因子相互协调,血管生成的减少与血管生成因子水平的下降直接相关。VEGF 是一种极为重要的血管生成因子,其作为一种特异的内皮细胞分裂源能够大大增加血管的通透性,目前已有许多研究的结果证明 VEGF 水平的高低是恶性肿瘤患者预后的独立预测因素<sup>[10]</sup>。IFN- $\alpha$  能够对 bFGF 的表达形成抑制作用,从而对新生肿瘤血管起到抵抗的效果,其机制主要是血管内皮细胞在 IFN- $\alpha$  的作用下对血管生成因子的敏感性降低。ATRA 的生物学活性主要是由细胞核内部的视黄素 X 受体与维甲酸受体所介导,其能够使 P53 与 Fas 等抑癌基因的表达增加,并使得 Bcl-2 的表达受到抑制,最终诱导肿瘤细胞发生凋亡或分化。除自身所具备的生物学活性之外,ATRA 还能够对血管生成因子的活性起到明显抑制的作用。体外实验表明,即使在视黄素的浓度处于中等或以下时,ATRA 仍能够对 VEGF、bFGF 等血管生成因子的表达起到较为明显的抑制作用<sup>[11]</sup>。另一方面,ATRA 还能够对血管内皮细胞的迁移及层粘连蛋白、胶原等细胞外基质的代谢起到抑制的作用。将 ATRA 与 IFN- $\alpha$  联合起来在介入围手术期配合化疗栓塞术,能够充分起到栓塞坏死、化疗杀伤、分化诱导的作用<sup>[12-15]</sup>。作为多血管恶性肿瘤,通过对新生血管的抑制能够在根本上对肿瘤的生长及进一步的转移起到及有意义的干预。

综上所述,介入围手术期 IFN- $\alpha$  联合 ATRA 的使用能够抑制新生肿瘤血管的生成,提高介入手术的临床疗效。

#### 参考文献:

- [1] 郑青平,倪秉强,伍美娟,等. 肝癌放疗前后血浆 VEGF 表达的临床意义[J]. 重庆医学,2010,39(3):288-289,291.
- [2] Nagano H, Kobayashi S, Marubashi S, et al. Combined-IFN- $\alpha$  and 5-FU treatment as a postoperative adjuvant following surgery for hepatocellular carcinoma with portal venous tumor thrombus [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(1): 3-10.
- [3] Yamanaka C, Wada H, Hama N, et al. A case of advanced hepatocellular carcinoma with inferior vena cava tumor thrombus and multiple intrahepatic metastases treated successfully by transcatheter arterial chemoembolization and radical hepatectomy [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2012, 39(12):1819-1821.
- [4] 杨占凤,倪克梁,林万隆,等. 围介入手术期联合应用 IFN- $\alpha$  及 ATRA 治疗肝癌的机制探讨[J]. 中华肝胆外科杂志,2010,16(4):295-299.
- [5] 李涛,智绪亭,周建炜,等. 小剂量阿司匹林协同干扰素- $\alpha$  抑制肝细胞肝癌生长转移的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志,2012,18(1):50-53.
- [6] 全毅,刘建刚,蔡悦成,等. 经肝动脉化疗栓塞联合肿瘤间质治疗肝癌临床研究[J]. 重庆医学,2010,39(8):924-926.
- [7] 刘子文,刘长征,刘卫,等. 全反式维甲酸抑制肝癌细胞增殖的作用机制研究[J]. 中华肝胆外科杂志,2012,18(5):386-388.
- [8] 林允仕,朱明月,周升,等. 甲胎蛋白调节肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 2 表达及其对 Bel 7402 细胞耐受该配体的影响[J]. 中华肝病杂志,2010,18(10):745-750.
- [9] Kalathil S, Lugade AA, Miller A, et al. Higher frequencies of GARP + CTLA-4 + Foxp3 + T regulatory cells and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients are associated with impaired T-Cell functionality [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8):2435-2444.
- [10] Kusano H, Ogasawara S, Akiba J, et al. Antiproliferative effects of sorafenib and pegylated IFN $\alpha$ 2b on human liver cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(6):1897-1903.
- [11] 董兆如,李涛,曲思凤,等. 小剂量阿司匹林协同干扰素- $\alpha$  诱导肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志,2012,18(4):292-295.
- [12] Zhu AX, Ancukiewicz M, Supko JG, et al. Efficacy, safety, pharmacokinetics, and biomarkers of cediranib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(6):1557-1566.
- [13] Lee YJ, Kim GH, Park do Y, et al. A case of epidural abscess occurred after liver abscess complicated by transarterial chemoembolization in a patient with metastatic cancer to liver [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2013, 61(4):225-229.
- [14] Cui YL, Li HK, Zhou HY, et al. Correlations of Tumor-associated Macrophage Subtypes with Liver Metastases of Colorectal Cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(2):1003-1007.
- [15] Koneri K, Hirono Y, Fujimoto D, et al. Five-year survival of alpha-fetoprotein-producing gastric cancer with synchronous liver metastasis: a case report [J]. *J Gastric Cancer*, 2013, 13(1):58-64.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-21)