

氢氧化钠瘤内注射通过抗血管生成作用抑制肝癌生长的机制研究*

严俊¹ 陶文照² 陈伟¹ 卢国锋³ 胡育新^{1△}

(1 上海市嘉定区中心医院肿瘤科 上海 201800 ; 2 第二军医大学长海医院病理科 上海 200433 ;

3 上海市嘉定区中心医院病理科 上海 201800)

摘要 目的:研究氢氧化钠溶液瘤内注射对肝癌的生长抑制作用并探索其机制。方法:对 SMMU-LTNM 肝癌裸鼠皮下模型进行 2%浓度的氢氧化钠溶液瘤内注射,检测肿瘤组织微血管密度、HIF-1 α 和 VEGF 的表达情况。结果:与生理盐水瘤内注射组相比,氢氧化钠显著抑制肿瘤生长($P<0.01$)、降低肿瘤微血管密度($P=0.01$)、抑制肿瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 的表达($P=0.02$ 和 $P=0.01$)。结论:氢氧化钠瘤内注射可有效抑制肝癌生长,主要机制可能是抗血管生成作用。

关键词 原发性肝癌 瘤内注射 氢氧化钠 抗血管生成

中图分类号 R735.7 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2011)07-1253-04

Effect of Intratumoral Injection of Sodium Hydroxide in Inhibition of Liver Tumor Growth*

YAN Jun¹, TAO Wen-zhao², CHEN Wei¹, LU Guo-feng³, HU Yu-xin^{1△}

(1 Department of Medical Oncology, Shanghai Jiading Central Hospital, Shanghai 201800, China;

2 Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China ;

3 Department of Pathology, Shanghai Jiading Central Hospital, Shanghai 201800)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of intratumoral injection of sodium hydroxide on the hepatocellular carcinoma and to investigate the mechanism. **Methods:** Nude mice bearing subcutaneous SMMU-LTNM tumors were given intratumoral injection with 2% sodium hydroxide or normal saline groups ($n = 10$ for each group). The inhibitive effects on tumor growth and tumor microvessel density, HIF-1 α and VEGF expression were detected. **Results:** Sodium hydroxide could significantly inhibit tumor growth ($P<0.01$). Microvessel density was significantly lower in the sodium hydroxide group ($P=0.01$), and the expression of HIF-1 α and VEGF was suppressed ($P=0.02$ and $P=0.01$, respectively). **Conclusion:** Intratumoral injection with sodium hydroxide could effectively inhibit tumor growth, the main mechanism of which may be the anti-angiogenic effects.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Intratumoral injection; Sodium hydroxide; Anti-angiogenic

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)07-1253-04

前言

原发性肝癌严重危害我国人民的生命健康^[1],大多数患者确诊时已经是晚期^[2-5],不适合接受手术等根治性的治疗手段,局部治疗成为晚期肝癌的主要治疗手段之一^[6]。本课题组前期的动物实验发现,氢氧化钠瘤内注射可以显著抑制肿瘤生长,无明显的副作用,且中高浓度氢氧化钠的注射效果优于无水酒精。但氢氧化钠抑制肿瘤生长的主要作用机制尚不清楚,本研究中我们拟进一步探索其抗肿瘤的作用机制,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

氢氧化钠,无水乙醇,生理盐水(0.9%氯化钠)均购于国药集团化学试剂有限公司。氢氧化钠依据实验设计,用生理盐水配置成 2%无菌溶液。BALB/c 雄性裸鼠 20 只,4~6 周龄,体重

(20 \pm 2)g,由第二军医大学实验动物中心提供,无特殊病原菌(SPF)级屏障系统内饲养。抗小鼠缺氧诱导因子(HIF)-1 α 、血管内皮细胞生成因子(VEGF)和 CD31 等抗体购于 Santa Cruz 公司。

1.2 人肝癌裸鼠移植瘤模型的建立

本研究使用上海长海医院病理科陶文照教授所建立的裸鼠人肝癌组织模型(SMMU-LTNM)^[7]。在无菌条件下将皮下移植瘤取出,并切成 2 mm \times 2 mm \times 2 mm 大小瘤块,用套管针将瘤块接种于上述 20 只裸鼠的前肢背部皮下,形成人肝癌裸鼠模型。

1.3 实验分组与给药方法

BALB/c 裸鼠背部皮下植入瘤块 2 周后,随机分为治疗组和对照组,分别给予 2% 氢氧化钠和生理盐水瘤内注射,注射液体体积均为 0.1 mL,每只动物在 d1、d5 和 d11 分别接受 1 次瘤内注射。

* 基金项目:上海市嘉定区科学技术委员会课题(2006JKK025)

作者简介:严俊(1973-),主治医师,肿瘤内科,晚期肿瘤治疗

△通讯作者:胡育新(1958-),副主任医师,晚期肿瘤治疗,肝癌 B 超介入治疗

(收稿日期:2011-01-07 接受日期:2011-01-31)

1.4 观察指标

肿瘤移植后及治疗期间,动态观察裸鼠移植瘤生长情况及裸鼠的体重变化、饮食和精神状态的变化。使用游标卡尺测量皮下瘤体大小,并按(长×宽/2)计算肿瘤体积。随机分组后每3天测量一次。取皮下移植瘤置于10%中性福尔马林液中固定,每个标本在近中心,无坏死初病例取材,切片后进行HE染色光镜下评估肿瘤的坏死情况,抗CD31、抗HIF-1 α 和抗VEGF免疫组织化学染色。

1.5 统计分析

统计学处理应用统计软件SPSS 12.0软件处理,计量资料的比较使用独立样本t检验,计数资料率的比较采用卡方检验 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤生长情况

生理盐水组裸鼠皮肤干燥、明显消瘦,氢氧化钠组裸鼠皮肤较为红润,进食良好。对照组裸鼠皮下肝癌渐进性生长较为迅速,氢氧化钠瘤内注射可以显著抑制皮下肝癌的生长(图1, $P<0.01$),实验结束时(d18),治疗组和生理盐水对照组肿瘤平均体积分别为(228.4 \pm 48.7)mm³和(603.0 \pm 139.6)mm³。

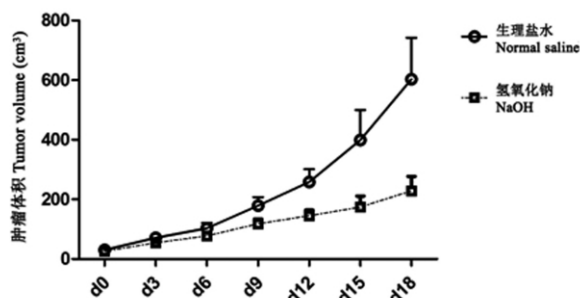


图1 治疗组和对照组肿瘤生长曲线

Fig 1 Tumor growth curves in the NaOH-treated group and the control

2.2 血管生成情况

图2A所示,氢氧化钠瘤内注射肿瘤出现较大范围的坏死,以瘤内注射处为中心,表面皮肤呈黑色。对照组肿瘤生长红润,未观察到该现象。肿瘤切片的抗CD31肿瘤血管染色显示,对照组肿瘤微血管密度(MVD)较高,平均为(16.1 \pm 7.8)/高倍视野。氢氧化钠组MVD平均为(8.3 \pm 4.3)/高倍视野,显著低于对照组($P=0.01$,图2B)。

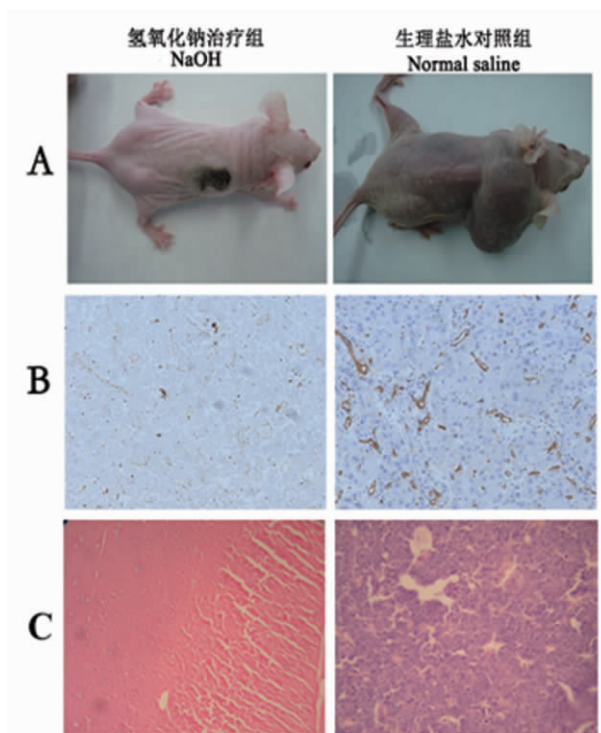


图2 瘤内注射氢氧化钠可显著抑制肿瘤生长,抑制血管生成和促进肿瘤坏死。氢氧化钠瘤内注射肿瘤出现较大范围的坏死,以瘤内注射处为中心,表面皮肤呈黑色(A左),肿瘤控制良好,且裸鼠生长良好,对照组肿瘤生长巨大,未见明显坏死(A右),且裸鼠一般状态不佳。肿瘤切片抗CD31染色,氢氧化钠治疗组微血管密度显著低于对照组(B)。肿瘤切片HE染色氢氧化钠治疗组可见广泛的肿瘤坏死(C)

Fig 2. Intratumoral NaOH injection could inhibit tumor growth and angiogenesis and induce tumor necrosis. Large-scale necrosis could be seen in the NaOH-treated tumors(A, left). The skin turned dark centered by the injection point; the tumor grew slowly, and the general conditions of the tumor-bearing mice were well. The tumor in the control grow very large and necrosis could be barely seen (A, right); the general conditions were bad. Tumor microvessel density were lower in the NaOH treated group than that in the control group (B), as evidenced by anti-CD31 immunostaining in the slides of the tumors. H&E staining also showed that NaOH caused large-scale necrosis (C)

2.3 血管生成因子的表达

对照组肿瘤组织HIF-1 α 染色以细胞浆和细胞核为主,呈广泛的着色,阳性率为70%;治疗组大多数肿瘤细胞HIF-1 α 染色较浅,染色阳性率仅为20%,显著低于对照组(表1, $P=0.02$)。氢氧化钠瘤内注射还可以显著降低肿瘤组织VEGF的表达(表1, $P=0.01$),治疗组和对照组VEGF染色阳性率分别为20%和80%。

表1 治疗组和对照组HIF-1 α 和VEGF表达情况

Table 1 HIF-1 α and VEGF expression in the tumors from the NaOH-treated group and the control group

	HIF-1 α 表达 HIF-1 α expression			VEGF 表达 VEGF expression		
	阳性 positive	阴性 negative	P 值 P value	阳性 positive	阴性 negative	P 值 P value
氢氧化钠治疗组(n=10) NaOH-treated group(n=10)	2	8	0.02	2	8	0.01
生理盐水对照组(n=10) Normal saline group(n=10)	7	3		8	2	

3 讨论

原发性肝癌是一种常见且危害人民健康最为严重的恶性肿瘤,防治形势十分严峻,5年生存率约3%,我国每年死于此病的患者多达20万人^[8]。原发性肝癌以手术切除为主,但因其恶性度高,极易早期转移且我国患者多合并肝硬化和肝功能失代偿,故临床切除率低且复发率高^[9],且能手术切除治疗的仅占20%。

肝癌瘤内药物注射,因其适应症广、创伤性小、疗效好、副作用少、操作简便、经济负担少等优点^[10-12],比较适合我国国情^[13]。对与小肝癌患者使用无水酒精肝癌体内注射,远期疗效并不亚于手术切除,5年生存率可达36%。但酒精注射存在穿透力不足、需反复多次注射、局部疼痛等弱点^[14],因此需进一步努力探索新的、更加理想的治疗药物以提高疗效和减少副作用^[15-17]。

本课题组前期的动物实验发现,中等浓度的氢氧化钠瘤内注射的抑瘤效果与高浓度相似,但毒性较小。中高浓度(浓度分别为2%和3%)氢氧化钠的注射效果优于无水酒精(待发表)。因此本研究选择了2%的浓度,并增加了一次瘤内注射(d1、d5和d11治疗3次),肿瘤体积的抑制率达到了60%以上,且未显示出明显的毒性反应。Jiang TA等对新西兰兔施行肝实质内注射氢氧化钠溶液,发现2.5%和5%的浓度可以引起显著的局灶性肝脏完全坏死,且2.5%的浓度具有较好的安全性^[18]。本研究验证了这一研究结果。

氢氧化钠瘤内注射对肝癌的治疗作用报道较少,且机制也不明确^[19]。本研究发现氢氧化钠注射周围形成了明显的皮肤黑变、坏死,而坏死周围肿瘤亦呈白色,表现出一种缺乏血供的表现,而对照组肿瘤红润,因此可以推测氢氧化钠瘤内注射可以抑制肿瘤的血管生成。进一步研究发现,氢氧化钠治疗可以显著降低肿瘤MVD。HIF-1 α 和VEGF是两个重要的血管生成因子,在肝癌的发生发展中其重要作用^[20,21]。肿瘤在生长过程中缺氧,形成局部的酸性环境,从而上调HIF-1 α 的表达,后者作为VEGF的主要的转录因子,可以上调VEGF的表达。氢氧化钠作为一种强碱,具有较好的渗透性,且在损伤肿瘤的同时,不提高肿瘤内的酸性,从而减少缺氧诱导因子下游的促血管生成因子的表达。本研究通过肿瘤组织切片的免疫组化染色发现,氢氧化钠可以显著抑制肿瘤组织HIF-1 α 和VEGF的表达,表现出较强的血管生成抑制作用。

综上所述,中等剂量氢氧化钠尤其在注射间隔时间缩短的状态下,3次注射好于2次注射,可以有效抑制肝癌生长,其主要机制可能是抗血管生成作用。

参考文献(References)

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108
- [2] Tang ZY, Ye SL, Liu YK, et al. A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(4): 187-196
- [3] Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma [J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(10): 698-711

- [4] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2005, 42(5): 1208-1236
- [5] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2003, 362(9399): 1907-1917
- [6] 梁雪婧, 朱尚勇, 梁水庭. 非手术局部损毁肿瘤方法治疗原发性肝癌的现状与进展[J]. 中国癌症防治杂志, 2009, 1(4): 362-364
Liang Xue-jing, Zhu Shang-yong, Liang Shui-ting. Advances in the nonsurgical local ablation therapies for primary liver cancer [J]. Chin J of Oncol Prev Treat, 2009, 1(4): 362-364
- [7] 陶文照, 徐冰, 龚志锦, 等. 人肝癌裸鼠连续传代的病理变化特征 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(2): 163-168
Tao Wen-zhao, Xu Bing, Gong Zhi-jin, et al. The pathologic changes of the serial passage of the human liver cancer cells in the nude mice model [J]. Chin J Cancer Biother, 2007, 14(2): 163-168
- [8] 杨秉辉. 原发性肝癌的诊断: 从临床到亚临床 [J]. 中华消化杂志, 2003, 23(6): 325-326
Yang Bing-hui. The diagnosis of primary liver cancer: from clinic to sub-clinic [J]. Chin Dig J, 2003, 23(6): 325-326
- [9] 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委员会, 中华医学会肝病学会分会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治专家共识 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(3): 259-269
CSLC, CSCO, Liver Cancer Study Group of Chinese Liver Disease Association. Expert consensus in the diagnosis and treatment of primary liver cancer [J]. Clin Oncol J, 2009, 14(3): 259-269
- [10] Shibata T, Maetani Y, Ametani F, et al. Percutaneous ethanol injection for treatment of adrenal metastasis from hepatocellular carcinoma [J]. AJR Am J Roentgenol, 2000, 174(2): 333-355
- [11] Lopez PM, Villanueva A, Llovet JM. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma--an updated analysis of randomized controlled trials [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2006, 23(11): 1535-1547
- [12] Bartolozzi C, Lencioni R, Ricci P, et al. Hepatocellular carcinoma treatment with percutaneous ethanol injection: evaluation with contrast-enhanced color Doppler US [J]. Radiology, 1998, 209 (2): 387-393
- [13] 李凯. 原发性肝癌的内科治疗 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(4): 1-4
Li Kai. Internal medical management of primary liver cancer [J]. Chin J Prev Treat, 2006, 13(4): 1-4
- [14] 邓卫萍, 曾爱琼, 陈丽辉, 等. 超声引导下经皮穿刺无水酒精注射治疗肝癌的护理配合 [J]. 海南医学, 2009, 20(9): 147-149
Deng Wei-ping, Zeng Ai-qiong, Cheng Li-hui, et al. Nursing cooperation on percutaneous ethanol injection under ultrasonic guidance in hepatic carcinoma [J]. Hai'nan Med J, 2009, 20(9): 147-149
- [15] Giorgio A. Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a simple, effective and cheap procedure for percutaneous ablation [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2010, 19(4): 461-462
- [16] Kwon JH. Is Percutaneous Ethanol Injection Therapy Still Effective for Hepatocellular Carcinoma in the Era of Radiofrequency Ablation? [J]. Gut Liver, 2010, 4(1): 105-112

- [17] Lencioni R, Crocetti L, Cioni D, et al. Single-session percutaneous ethanol ablation of early-stage hepatocellular carcinoma with a multi-pronged injection needle: results of a pilot clinical study [J]. J Vasc Interv Radiol, 2010, 21(10): 1533-1538
- [18] Jiang TA, Zhao QY, Chen MY, et al. Low-concentration sodium hydroxide solution injection in normal liver parenchyma of rabbits [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(2): 285-290
- [19] Rao W, Liu J, Zhou YX, et al. Anti-tumor effect of sodium-induced thermochemical ablation therapy[J]. Int J Hyperthermia, 2008, 24(8): 675-681
- [20] 李姗姗, 姚登福, 董志珍. 肝缺氧诱导因子-1 α 与肝癌发生、发展及治疗研究新进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(4):361-367
- Li SS, Yao DF, Dong ZZ. Advances in understanding the relationship between hepatic hypoxia-inducible factor-1 α and hepatocellular carcinoma[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 2010, 18(4):361-367
- [21] Kaseb AO, Hanbali A, Cotant M, et al. Vascular endothelial growth factor in the management of hepatocellular carcinoma: a review of literature[J]. Cancer, 2009, 115(21):4895-906

封面说明

共同的画卷

封面设计说明

自 1997 年第一只克隆羊多利的诞生拉开了人造生命的序幕,2010 年,可谓是人造生命科学发展的一个新的里程碑。本刊 2011 年封面设计的灵感来自于人造生命技术的蓬勃发展。① 封面背景以第三代测序技术即基于纳米孔的单分子实时 DNA 测序技术的研制成功为契机(图中,偏下),这为人造生命及人类健康提供了强有力的技术支撑。② 封面图案以 2010 年诺贝尔生理与医学奖的体外受精技术(即试管婴儿),最强壮晶胚的筛选技术,人工卵巢及人类卵细胞的培育技术为主体(图上,右,中,左),这些不仅为不孕不育患者带来了福音,同时为社会的稳定与和谐贡献了力量。③ 封面图案同时也融合了人造生命的最新研究成果即首个能自我生长,繁殖的人造生命细胞 Synthia 的问世(六边形图,右),由干细胞培育出的肺脏(六边形图,左)等最新研究成果。④ 封面图案同时也展示了人造生命发展的伦理学争议与潜在的危机,关于艾滋病的研究取得了很多成就,但我们还没有攻克艾滋病,特别是 Superbug 耐药性超级细菌的出现,让无数人感到前所未有的恐慌(六边形,中)。⑤ 生命科学的一切研究成果,只不过是生物医学历史的长河中一朵浪花,因此图片采用波浪形设计,如河流奔涌向前,如画卷色彩缤纷,如电影胶片所有的成就与辉煌一闪而过,未来会更加让人期待。新技术新理论的发明与发展,需要有准备的大脑,也需要灵光突闪的思想火花。对于与人类密切相关的生物医学领域,我们如图中的小孩一样,睁大纯真的眼睛,好奇的观察、了解,我们也需要运用一系列的技术手段,面对未知的一个个“黑箱”问题,需要细心大胆的研究、推断,同时我们需要时刻警觉生命科学技术发展应用这把双刃剑潜伏的危机,应当科学探索并利用自然规律来更好的为人类服务。

我们坚信《现代生物医学进展》正是为生物医学领域的科研工作者提供了这样一个可以充分挥洒展示的画卷的平台,不断记录着生物医学领域最新最成功的成果。这是我们共同的画卷,让我们与你们共同分享灵感与喜悦,成功与辉煌!