

达肝素钠对早期肝癌的生长抑制作用

闫钧, 郑起, 汪昱, 潘烨, 邱文才, 陆洪芬, 薛琼, 汤钊猷

■背景资料

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 肿瘤生长和转移复发与血管生成密切相关。本实验采用人肝癌裸鼠转移模型, 研究法安明在早期肝癌细胞生长过程中对血管形成的抑制作用。

闫钧, 郑起, 汪昱, 潘烨, 邱文才, 上海交通大学医学院附属第六人民医院普外科 上海市 200233
陆洪芬, 复旦大学附属肿瘤医院病理科 上海市 200232
薛琼, 汤钊猷, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所 上海市 200232
上海市卫生局基金资助项目, No. 00441
作者贡献分布: 此课题由闫钧和郑起设计; 研究过程由闫钧, 汪昱, 潘烨及邱文才操作完成; 数据分析由陆洪芬, 薛琼及汤钊猷完成; 本论文写作由闫钧完成。
通讯作者: 郑起, 200233, 上海市, 上海交通大学医学院附属第六人民医院普外科, sh6_zhengqi@126.com
电话: 021-64369181
收稿日期: 2008-05-10 修回日期: 2008-06-16
接受日期: 2008-06-23 在线出版日期: 2008-08-08

Inhibitory effect of dalteparin sodium on the growth of early-stage hepatocellular carcinoma

Jun Yan, Qi Zheng, Yu Wang, Ye Pan, Wen-Cai Qiu, Hong-Fen Lu, Qiong Xue, Zhao-You Tang

Jun Yan, Qi Zheng, Yu Wang, Ye Pan, Wen-Cai Qiu, Department of General Surgery, the Sixth Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China

Hong-Fen Lu, Department of Pathology, Cancer Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Qiong Xue, Zhao-You Tang, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Supported by: the Health Administration Foundation of Shanghai Municipality, No. 00441

Correspondence to: Qi Zheng, Department of General Surgery, the Sixth Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200233, China. sh6_zhengqi@126.com

Received: 2008-05-10 Revised: 2008-06-16

Accepted: 2008-06-23 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate the inhibition of dalteparin sodium (low molecular weight heparins) on early hepatocellular carcinoma (HCC) in nude mice.

METHODS: The metastatic model of HCC was established in 40 nude mice, which were randomly divided into 4 groups: control group (treated with saline), chemotherapy group (treated with 5-fluorouracil and cis-dichlorodiamine platinum), dalteparin sodium treatment group,

and combined treatment group (treated with dalteparin sodium, 5-fluorouracil and cis-dichlorodiamine platinum). The following parameters, such as tumor size, tumor inhibition rates, alpha fetoprotein (AFP) and intratumoral microvessel density (MVD), were evaluated respectively 14 d after operation.

RESULTS: In comparison with that in the control group, the tumor size was significantly reduced in the chemotherapy group, dalteparin sodium group and combined group (26.25 ± 11.55 , 33.70 ± 14.78 , 17.25 ± 6.80 mm³ vs 68.47 ± 22.04 mm³; all $P < 0.05$); the tumor inhibition rates showed that dalteparin sodium had a satisfactory depressing effect on tumor growth. The MVD values were markedly lower in the dalteparin sodium group and combined group than those in the control group and chemotherapy group (5.2 ± 1.55 , 4.7 ± 2.21 vs 19.34 ± 3.57 , 17.1 ± 3.03 ; all $P < 0.05$). Moreover, the level of alpha-fetoprotein was significantly decreased in the chemotherapy group, dalteparin sodium group and combined group as compared with that in the control group (14.56 ± 8.87 mg/L, 13.36 ± 7.60 mg/L, 11.57 ± 7.82 mg/L vs 22.20 ± 6.29 mg/L, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Dalteparin sodium can suppress tumor growth and metastasis by inhibiting tumor angiogenesis of early-stage HCC.

Key Words: Heparins; Hepatocarcinoma; Angiogenesis; Dalteparin sodium

Yan J, Zheng Q, Wang Y, Pan Y, Qiu WC, Lu HF, Xue Q, Tang ZY. Inhibitory effect of dalteparin sodium on the growth of early-stage hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(22): 2512-2515

摘要

目的: 研究达肝素钠(法安明)对早期肝癌生长的抑制作用。

方法: 采用人肝癌裸鼠转移模型(LCI-D20)40只, 随机分成4组, 即对照组(生理盐水)、化疗组(顺铂+5-氟尿嘧啶)、法安明组、联合组(顺

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

铂、5-氟尿嘧啶与法安明). 分别于术后第14天处死观察肿瘤大小、抑瘤率、血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)和肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD).

结果: 化疗组、法安明组、联合组分别与对照组进行对比, 其肿瘤明显缩小(26.25 ± 11.55 , 33.70 ± 14.78 , $17.25 \pm 6.80 \text{ mm}^3$ vs $68.47 \pm 22.04 \text{ mm}^3$, 均 $P < 0.05$); 抑瘤率结果也提示法安明对肿瘤有良好的抑制作用. 法安明组和联合治疗组肿瘤组织内微血管及新生血管形成显著低于对照组和化疗组(5.2 ± 1.55 , 4.7 ± 2.21 vs 19.34 ± 3.57 , 17.1 ± 3.03 , 均 $P < 0.05$), 化疗组、法安明组、联合组的AFP较对照组有明显降低(14.56 ± 8.87 , 13.36 ± 7.60 , $11.57 \pm 7.82 \text{ mg/L}$ vs $22.20 \pm 6.29 \text{ mg/L}$, 均 $P < 0.05$).

结论: 法安明通过抗肿瘤血管形成, 对早期肝癌的生长有抑制作用.

关键词: 肝素; 肝脏肿瘤; 血管生成; 法安明

闫钧, 郑起, 汪昱, 潘桦, 邱文才, 陆洪芬, 薛琼, 汤钊猷. 达肝素钠对早期肝癌的生长抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2512-2515
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2512.asp>

0 引言

肿瘤患者往往伴发高凝血症及血管栓塞, 有资料显示癌症合并静脉血栓患者, 肝素的使用明显改善患者的生存^[1-2]. 同时研究表明, 肿瘤生长和转移复发与血管生成密切相关^[3-4]. 本实验采用人肝癌裸鼠转移模型(LCI-D20, 简称肝癌模型), 研究法安明在早期肝癌细胞生长和转移过程中对血管形成的抑制作用.

1 材料和方法

1.1 材料 BABL/C裸小鼠(上海中科院实验动物中心提供), ♂, 40只, 鼠龄4-6 wk, 体质量约20 g, 在SPF级条件下饲养, 构建肝癌模型14 d后即早期肝癌模型^[5]. 本组瘤源为第141代. 兔抗人F8因子(Dako公司, 1:300), Dako抗鼠EnVision™加强型试剂盒, 0.5 g/L DAB(Dako公司)染色; 低分子肝素(法安明, 法玛西亚普强公司); 5-氟尿嘧啶(5-FU, 上海旭东海普药业); 顺铂(齐鲁制药).

1.2 方法

1.2.1 分组: 肝癌模型随机分成4组, 每组10只, 分别设为对照组: 生理盐水腹腔内注射; 化疗组: ip 5-FU 30 mg/(kg·d)+顺铂2 mg/(kg·d), 共用5 d; 法安明组: sc法安明1800 IU/(kg·d)共用14 d; 联合治

疗组: ip 5-FU、顺铂和sc法安明.

1.2.2 肿瘤增长抑制率的测定: 模型构成后第2天即术后第1天开始干预用药, 法安明sc, 其他为腹腔用药. 实验第14天分别处死裸鼠, 检测肿瘤体积 $[V(\text{mm}^3) = (\text{长} \times \text{宽})^2/2]$ 、肿瘤增长抑制率 $\text{TGI}(\%) = [(C_x - T_x)/C_x \times 100\%]$ (C_x 和 T_x 分别为对照组和治疗组肿瘤平均体积)^[6].

1.2.3 血清学分析: 采集裸鼠血清, 放免法测定AFP含量.

1.2.4 肿瘤微血管密度(MVD)测定: 对第8因子免疫组织化学染色的肿瘤微血管参照文献Weidner *et al*^[7]的方法进行计数. 计数由两位不知临床资料的病理科医生在多筒显微镜下同时进行, 先在低倍镜40倍下全面观察切片选定残癌组织内血管密度最高处(即热点), 然后在200倍镜下取3个视野分别计算所有染色的微血管, 取3个测定值的平均数为该病例的MVD值. 在计数微血管时, 以与周围肿瘤细胞和结缔组织成分有明显区别的任何一个染成棕色的血管内皮或内皮细胞簇作为一个血管计算, 只要结构不相连, 其分枝结构也作为一个血管计数.

统计学处理 组间比较用方差分析, 率比较用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为统计学上有显著性意义.

2 结果

2.1 肿瘤生长和抑制 化疗组、法安明组、联合组分别与对照组比, 肿瘤明显缩小($P < 0.05$), 从抑瘤率结果也提示法安明对肿瘤有良好的抑制作用. 法安明组和联合组与化疗组比较抑制肿瘤作用略差, 但统计学比较无明显差异($P > 0.05$, 表1).

2.2 MVD计数 镜下观察, 对照组实体瘤血管形成明显多于法安明组和联合组. 化疗组与对照组比较, MVD计数差异无显著意义($P > 0.05$). 法安明组和联合治疗组肿瘤组织内微血管及新生血管形成明显少于对照组, MVD显著低于化疗组($P < 0.05$, 表1). CD31计数也与MVD计数相类似的结果.

2.3 肿瘤相关指标 对照组的AFP有异常升高. 化疗组、法安明组、联合组的AFP比对照组有明显降低($P < 0.05$, 表1).

3 讨论

肝癌总体预后较差, 主要与肝癌富有血供, 并具有较强的侵袭性有关. 有学者于1970年代首次提出“肿瘤生长依赖于血管形成”的观点^[1]. 一系

■创新盘点

本研究重点观察肿瘤微血管密度等数值来探讨法安明对其早期肝癌生长抑制的效果进行初步评价.

■应用要点

本实验结果显示法安明通过抑制肿瘤血管形成,对体内早期肝癌生长具有抑制作用。

表 1 各实验组实验结果比较一览表 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	肿瘤体积(mm ³)	抑瘤率(%)	肿瘤微血管密度	甲胎蛋白(mg/L)
对照组	68.47 \pm 22.04	0	19.34 \pm 3.57	22.20 \pm 6.29
化疗组	26.25 \pm 11.55 ^b	61.66	17.10 \pm 3.03	14.56 \pm 8.87 ^b
法安明组	33.70 \pm 14.78 ^b	50.78	5.20 \pm 1.55 ^{bd}	13.36 \pm 7.60 ^b
联合组	17.25 \pm 6.80 ^{bf}	74.81	4.70 \pm 2.21 ^{bd}	11.57 \pm 7.82 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 化疗组; ^f $P < 0.01$ vs 法安明组。

列研究也证实,血管的生成是体积大于1-2 mm³实体瘤生长和癌细胞转移的前提条件^[8]。我们在以前的研究已经发现了达肝素钠对肝癌生长有抑制作用,对其他脏器的转移也有抑制的作用^[9],本实验的研究是要观察在早期的肝癌动物模型上达肝素钠是否对肝癌的生长有抑制作用。

我们选用法安明较肝素有以下优点:抗凝血Xa因子作用更强、抗凝血IIa因子作用弱、抗血栓作用强、出血副作用小;分子质量小,生物利用度高,血浆半衰期长;能与肝素不结合的蛋白相结合,因此有更稳定的量效关系。法安明具有皮下注射生物利用度高(90%)和副作用小等特点,为此被选为实验用药。

研究表明肝素影响血管内皮细胞增生是通过影响血管形成因子,特别是成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGFs)与血管内皮生长因子(VEGFs)来完成的。低分子肝素可通过竞争性结合细胞硫酸乙酰肝素受体来抑制血管形成,能阻止细胞外组成物的溶解、细胞黏附以及细胞扩增与迁移,并起一定的屏障作用^[5];关键肝素能阻止肿瘤对血管与组织的侵犯^[8]。已有研究证实,低分子肝素可以抑制肝素酶的活性和减少肿瘤转移^[8-10]。同时有研究表明低分子量肝素有下调COX-2的作用,通过一系列途径作用VEGF基因,减少VEGF mRNA和蛋白水平的上调,进而减少肿瘤新生血管的产生。阻止肿瘤对血管与组织的侵犯,结合生长因子以及血管生成蛋白抑制肿瘤血管的形成;肝素是多糖类药物有抗癌作用;法安明经研究证实可抑制肝素酶活性和减少肿瘤转移^[11-12]。

本实验结果提示:法安明可抑制肿瘤生长,与对照组比较尤其明显,但是不如化疗组,与化疗药物联合并不能增加疗效,提示抗肿瘤不仅仅是抗肿瘤药物的单纯叠加那么简单,如何有协同作用尚需进一步研究。结果还提示:低分子肝素法安明可降低MVD表达,从而证实了法安明有抑制肿瘤血管形成的作用。本研究结果还

表明:低分子肝素法安明可使AFP降低。本研究表明肝癌诱导产生大量结构和功能异常的血管,如管壁不完整和缺乏基膜等,此时肿瘤细胞极易脱离母瘤而进入血管并形成转移。法安明通过抑制肿瘤新生血管形成,减少了肝癌细胞血液转移的途径。

实验结果表明法安明在肝癌转移模型中有抑制肿瘤生长作用,通过抑制肿瘤血管形成有良好的抑制肿瘤转移的作用。探索法安明是否有临床价值尚需通过进一步大样本实验和临床研究。法安明抑制肿瘤的最低有效剂量也有待于进一步研究。同时在法安明中产生抑制肿瘤生长、转移作用的有效结构或者基团也有待于进一步探索与研究。

本研究中观察到,对照组实体瘤血管形成,且新生血管缺乏周细胞,基底膜不完整,使癌细胞具有侵袭、转移的潜能,易进入血液循环,并远处转移。化疗组与对照组相比,MVD差异无显著意义;而低分子肝素组与联合组MVD明显低于化疗组和对照组,肿瘤血管内皮细胞处于静止状态,几乎无新生血管形成,癌细胞处于休眠状态。MVD、SMA以及VEGF的阳性率均有明显减少,导致肿瘤组织的体积、肿瘤分泌的AFP、CEA等均有明显减少。故低分子肝素的应用有一定的抑瘤率,同时减少了肿瘤新生血管的形成。同时由于肿瘤组织的血管壁不完整,缺乏完整的平滑肌,有报道顺铂等化疗药物有一定抑制血管平滑肌作用,所以SMA的表达在各治疗组之间没有明显的区别,与对照组相比有意义。对本研究中联合组疗效较化疗组略差,可能与低分子肝素抑制新生血管形成,使得肿瘤组织内形成新生血管大为减少,导致化疗药物进入肿瘤组织减少有关^[10]。血管生成抑制剂的应用,为解决传统化疗药物肿瘤耐药问题提供了一个新的思路。一方面,血管生成抑制剂有望成为传统化疗后新的一种药物治疗手段;另一方面,应用血管生成抑制剂又可能抑制残留病灶

的生长, 也可使微小转移灶处于休眠状态, 从而控制微小病灶引起的临床复发与转移, 达到肿瘤亚临床治疗的新水平^[11-12], 低分子肝素可能具有此作用。

本实验结果证实低分子肝素通过抑制肿瘤血管形成, 对体内早期肝癌生长具有抑制作用。血管生成抑制剂与传统化疗药物的序贯性治疗有待进一步研究证实。同时低分子肝素治疗剂量与抑制肿瘤的关系也有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Bereczky B, Gilly R, Rásó E, Vágó A, Tímár J, Tóvári J. Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22: 69-76
- 2 王凤山, 刘永锋. 转移性肝癌的治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 115-119
- 3 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257
- 4 徐克成, 牛立志. 肝癌的冷冻治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 229-235
- 5 Sun FX, Tang ZY, Lui KD, Ye SL, Xue Q, Gao DM, Ma ZC. Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice via orthotopic implantation of histologically intact tissues. *Int J Cancer* 1996; 66: 239-243
- 6 程树群, 周信达, 汤钊猷. 高功率聚焦超声联合肝素可

- 7 的松治疗肝癌的实验研究. 中华消化杂志 1999; 19: 10-12
- 7 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887
- 8 Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, van Hinsbergh VW. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res* 2000; 60: 6196-6200
- 9 闫钧, 郑起, 汪昱, 陆洪芬, 薛琼, 汤钊猷. 达肝素钠对肝癌生长转移抑制的实验研究. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 359-361
- 10 Zcharia E, Metzger S, Chajek-Shaul T, Friedmann Y, Pappo O, Aviv A, Elkin M, Pecker I, Peretz T, Vlodavsky I. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and mammary gland morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 311-322
- 11 El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1299-1305
- 12 Abe W, Ikejima K, Lang T, Okumura K, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol* 2007; 46: 286-294

■同行评价

本研究设计合理, 数据可靠, 结果可信, 具有非常重要的意义和应用前景。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。(常务副总编辑: 张海宁 2008-08-08)