

## • 临床检验研究论著 •

## 恩度联合肝动脉化疗栓塞治疗中晚期肝癌的生物学检测研究

马国建,陈森清,李金田,徐清宇,尹国文<sup>△</sup>

(江苏省肿瘤医院遗传学和分子生物室,江苏南京 210009)

**摘要:目的** 观察重组人血管内皮抑制素(恩度)联合肝动脉化疗栓塞(TACE)治疗中晚期肝癌的前后生物学变化。**方法**

39例中晚期肝癌患者均为入院后首次进行恩度联合TACE手术治疗,39例患者分别在术前及术后第5、7、10天抽取抗凝外周血,采用ELISA检测其血清中的血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )及转化生长因子(TGF- $\beta$ )治疗前后变化,即分为39例治疗前组和39例治疗后组。另外在术前(39例治疗前组)和术后第10天做外周血淋巴细胞微核试验,微核试验阴性对照外周血取自南京市市级机关医院健康体检人群59例(59例健康对照组)。**结果** 经恩度联合TACE治疗后,39例治疗后组患者的血清的细胞因子水平均下降,其中VEGF与治疗前组相比明显下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );同时患者的平均微核率(MNF)经治疗后为 $(1.38\pm1.32)\%$ 与治疗前组的 $(2.19\pm1.56)\%$ 相比明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 通过研究恩度联合TACE治疗中晚期肝癌患者的前后生物学变化,将对以后治疗肝癌在剂量选择、疗效判断上产生积极监测指导作用。

**关键词:**肝肿瘤; 内皮抑素类; 血管抑制素类; 放射学,介入性; 微核试验**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.013**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)24-2974-02**Biological monitoring study on rh-endostatin combined with TACE for treating intermediate-advanced hepatocellular carcinoma**Ma Guojian, Chen Senqing, Li Jintian, Xu Qingyu, Yin Guowen<sup>△</sup>

(Genetics and Molecular Biology Laboratory, Tumor Hospital of Jiangsu province, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

**Abstract: Objective** To investigate biological change on rh-Endostatin(rH-ES) combined with TACE for treating intermediate-advanced hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** Into the hospital after the first 39 patients of HCC are rH-ES combined the TACE surgical treatment. 39 patients in the preoperative and postoperative days 5, 7, 10 collected anticoagulant peripheral blood were measured by ELISA serum VEGF, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  changes before and after treatment, that is divided into 39 cases before the treatment group and 39 cases of group after treatment. In addition, the micronucleus(MN) test in peripheral blood of patients before and 10 days after treatment groups were been done, micronucleus test negative control peripheral blood taken from the Nanjing municipal hospital authorities healthy people(59 cases of healthy control group). **Results** The depression of VEGF, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  were observed in the HCC patients after rH-ES combined with TACE treatment groups, the differences of VEGF between before and after rH-ES treatment was statistically significant( $P<0.05$ ); The difference of frequency of micronucleus(MNF) between patients after treatment $(1.38\pm1.32)\%$  and before treatment group $(2.19\pm1.56)\%$  was statistically significant( $P<0.05$ )。 **Conclusion** Combined with TACE through research rH-ES before and after treatment in patients with HCC biological changes, will have a positive monitoring role in guiding the future treatment of HCC in dose selection, efficacy judgments.

**Key words:** liver neoplasms; endostatins; angiostatins; radiology, interventional; micronucleus tests

肝动脉化疗栓塞术(TACE)治疗中药剂与疗效以及个体化差异等矛盾突出,因此对TACE治疗中的肿瘤标志物与恶性肿瘤相关因子进行生物学监测显得重要<sup>[1-2]</sup>。重组人血管内皮抑制素(恩度)是国内学者自主研发的抗血管生成类药物,对肿瘤血管的生成具有抑制作用。临床试验结果已证明恩度对晚期非小细胞肺癌具有明显的疗效<sup>[3]</sup>。但恩度在晚期恶性复发肿瘤中应用的报道较少。本研究对肝癌患者采用恩度联合TACE治疗,并对其治疗过程中的外周血自发微核形成、血管生长因子等生物学指标进行观察,旨在研究生物学监测在治疗中晚期恶性肿瘤中的意义。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 2010年10月至2011年4月,随机选取本院中晚期肝癌患者39例,均为入院后首次进行恩度联合TACE治疗的患者,其中男36例,女3例,年龄29~82岁,平均57.6岁,即治疗前、后组各39例。患者选择标准不包括以下4种情况:肝功能Child分级C级者;合并其他心脑肺肾严重器质性

疾病者;肝动脉造影显示肿瘤为少血供者;合并精神性疾病或语言表述不清者。所有患者均有明确影像学表现及甲胎蛋白(AFP) $>400\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 或肝穿活检病理诊断为中晚期肝癌。另外在术前(治疗前组)和术后第10天做外周血淋巴细胞微核试验,微核试验阴性对照外周血取自南京市市级机关医院健康体检人群59例(健康对照组)。

**1.2 仪器与试剂** 采用ELISA法检测的试剂均为eBioscience公司产品,由浙江联科生物技术有限公司提供。

**1.3 方法**

**1.3.1 TACE治疗方法及过程** 全部患者采用改良Seldingers技术经股动脉穿刺插管至肝固有动脉或肿瘤供血动脉,行TACE术。观察肿瘤染色情况,确认无A-V瘘及其他栓塞禁忌证后,将表柔比星40~60 mg联合超液化碘油10~20 mL以及恩度30 mg三者充分混合成乳剂沿肝动脉缓缓注入肝脏的肿瘤血管,然后用1~2 mm的明胶海绵颗粒栓塞供血动脉,再次行数字减影血管造影,见原肿瘤染色消失后结束

手术。

**1.3.2 实验标本收集及检测** 所有患者进行恩度联合 TACE 术治疗,在术前及术后第 5、7、10 天抽取抗凝外周血 3 mL, 离心分离血清并保存于-80 ℃的环境下备用, 并将此标本采用 ELISA 法检测细胞因子如血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )及转化生长因子(TGF- $\beta$ )。所有检测均严格按照试剂盒说明书操作。同时术前和术后第 10 天抽取的外周血在离心分离前分别取出 0.2 mL 全血, 做外周血淋巴细胞微核试验。

**1.3.3 外周血淋巴细胞微核试验** 0.2 mL 抗凝全血加入到 0.5 mL Tip 管, 再加入 0.08 mL 3% 明胶(新鲜配制), 混匀、无气泡后, 生理盐水 37 ℃水浴 45 min, 吸上清液, 并将其吸入到另一 0.5 mL Tip 管内, 离心, 弃上清, 微量沉淀物用振荡器混匀, 以 10  $\mu$ L 加样器吸出, 推片, 风干, 100% 甲醇固定 1 min, Giemsa 染色。每例标本计数 2 000 个完整淋巴细胞, 记录微核细胞数, 以% 表示。分析指标与注意事项等详见文献[4]。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。计量资料采用两样本均数  $t$  检验及配对设计  $t$  检验分析处理, 两组间比较采用 U 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 治疗前后外周血淋巴细胞自发微核变化** 39 例中晚期肝癌患者进行恩度联合 TACE 治疗, 其治疗前平均自发微核率(MNF)为(2.19 ± 1.56)%, 治疗后第 10 天为(1.38 ± 1.32)%, 分别与健康对照组(0.51 ± 0.78)% 比较,  $P < 0.01$ ; 治疗前 MNF 与术后第 10 天比较,  $P < 0.05$ 。

**2.2 恩度联合 TACE 治疗前后细胞因子水平比较**, 见表 1。

表 1 恩度联合 TACE 治疗前后细胞因子水平比较

检测项目 (ng/mL)	治疗前组	治疗后组		
		第 5 天	第 7 天	第 10 天
TGF- $\beta$	249.6 ± 167	224.0 ± 177	251.3 ± 215	199.4 ± 167
TNF- $\alpha$	164.9 ± 76	172.0 ± 62	167.0 ± 79	139.0 ± 40
VEGF	211.1 ± 252	188.3 ± 242	166.9 ± 198	67.4 ± 55*

\*:  $P < 0.05$ , 与治疗前组比较。

**2.3 临床多因素分析** 39 例患者经过恩度联合 TACE 治疗后, 肿瘤明显缩小、自觉症状改善者为 33 例, 治疗有效率为 84.6% (33/39); 治疗无明显好转者 6 例, 治疗无效率为 15.3% (6/39)。

## 3 讨 论

对恩度联合 TACE 治疗中晚期肝癌患者的外周血 MNF、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  以及 VEGF 水平变化进行了全程检测, 结果显示, 39 例患者经治疗后, 所检测的 4 个指标值在所监测的时间区段内都有明显下调, 表现出明显“时间-量效”关系。术前与术后第 10 天的 MNF 比较,  $P < 0.05$ 。人体内淋巴细胞微核综合反映致癌剂对人体细胞的诱变效应以及人体对异常细胞的清除能力, 在肿瘤的防治研究中被研究者采用<sup>[5-7]</sup>。本研究显示, 经治疗后患者自发微核形成明显下降, 反映出微核作为一个治疗效果监测标志物的敏感性和有用性。

治疗后第 10 天 VEGF 血清水平比治疗前差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 血清 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  水平分别比治疗前明显下降, 差异无统计学意义, 与文献报导有一定的差距<sup>[8-9]</sup>, 统计中均数出现较大的偏离所致。通过复查, 发现有 7 份血清样

本的细胞因子检测数据在治疗前后无明显改变或者甚至升高, 而后对其进行临床多因素分析, 发现其中 6 例在恩度联合 TACE 治疗后继发出现了肝肿瘤腹腔、肺及淋巴结转移等病理性改变且患者自觉症状差, 证实是恩度联合 TACE 治疗无效病例。本组数据清楚地反映血清 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  以及 VEGF 水平变化, 与治疗无效或者是病情恶化患者呈相关性。

影响肿瘤患者疗效的重要因素是药物敏感性差异以及相同疗法不同疗效, 因此加强肿瘤患者治疗过程中生理学反应的监测是指导合理疗法及用药的有效手段<sup>[1-2]</sup>。因此选择有效的生物学监测方法就显得尤为突出。选择 4 个检测指标来监测肝癌患者治疗前后的生物学改变, 本研究证实了 4 个指标监测的有用性和近期肿瘤相关研究结果相似。从实验数据分析, 恩度联合 TACE 治疗前后 VEGF、TNF- $\alpha$  的指标与有些文献数据有差距, 主要直接因素是本研究存在治疗无效病例, 其检测数值影响了统计均数, 但也真实反映了治疗过程中患者个体差异性, 对今后治疗肝癌在剂量选择、疗效判断上产生积极指导监测作用, 但同时还需要扩大样本加以验证。

## 参考文献

- [1] Li CY, Wang XL, Wang JH, et al. Identifying serum biomarkers for TACE therapy efficiency of hepatocellular carcinoma [J]. Front Biosci, 2011, 3(1): 212-220.
- [2] Ross CJ, Rennert J, Schacherer D, et al. Image fusion with volume navigation of contrast enhanced ultrasound(CEUS) with computed tomography(CT) or magnetic resonance imaging(MRI) for post-interventional follow-up after transcatheter arterial chemoembolization(TACE) of hepatocellular carcinomas(HCC): Preliminary results [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2010, 46(2/3): 101-115.
- [3] Liu ZJ, Wang J, Wei XY, et al. Predictive value of circulating endothelial cells for efficacy of chemotherapy with Rh-endostatin in non-small cell lung cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(6): 927-937.
- [4] Wang HL, Ning T, Li M, et al. Effect of endostatin on preventing postoperative progression of distant metastasis in a murine lung cancer model [J]. Tumori, 2011, 97(6): 787-793.
- [5] 刘静, 白欧. 外周血淋巴细胞微核检测在良性、癌前病变及恶性疾病中的意义 [J]. 吉林医学, 2009, 30(21): 2703-2704.
- [6] Lent EM, Crouse LC, Quinn MJ Jr, et al. Assessment of the in vivo genotoxicity of isomers of dinitrotoluene using the alkaline Comet and peripheral blood micronucleus assays [J]. Mutat Res, 2012, 742(1/2): 54-60.
- [7] Cardinale F, Bruzzi P, Bolognesi C. Role of micronucleus test in predicting breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis [J]. Br J Cancer, 2012, 106(4): 780-790.
- [8] Mekevan OG, Pelkov PI, Kotow SV, et al. Investigating the relationship between in vitro-in vivo genotoxicity: derivation of mechanistic QSAR models for in vivo liver genotoxicity and in vivo bone marrow micronucleus formation which encompass metabolism [J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(2): 277-296.
- [9] 陈卫, 邓俊, 杨小姐, 等. 肝癌双灌注介入治疗后血清 TNF- $\alpha$ 、sIL-2R 及 VEGF 水平与预后关系 [J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(1): 60-62.

(收稿日期: 2012-07-23)