

# 双氢青蒿素对原发性肝癌大鼠的治疗作用及机制

盛庆寿<sup>\*</sup>, 王武, 郭洪武

(广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

**[摘要]** **目的:**研究不同剂量双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)在二乙基亚硝胺(DEN)诱发肝细胞癌大鼠体内的抗癌作用及机制。**方法:**120只SD大鼠随机分成DEN造模组100只和正常组20只,造模组用DEN溶液诱发大鼠肝癌模型后分DHA高(60 mg·kg<sup>-1</sup>)、中(30 mg·kg<sup>-1</sup>)、低(15 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量组、恩度组(5 mg·kg<sup>-1</sup>, ip, 每天1次, 2周为1个疗程, 停药1周后再继续用药)及模型组各20只,按相应药物剂量灌胃给药6周;免疫组化法检测大鼠肿瘤组织血管内皮生长因子(VEGF)表达;ELISA法检测大鼠血清VEGF、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)、甲胎蛋白(AFP)表达;全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL);实验结束后记录剩余各组大鼠的总生存时间,计算生命延长率。**结果:**与模型组比较,DHA中、高剂量组的大鼠肿瘤组织VEGF表达明显降低;血清的VEGF、VEGFR-2、AFP表达也明显降低;剩余大鼠生存时间明显延长,生命延长率分别达到19.25%和12.81%。**结论:**DHA在30,60 mg·kg<sup>-1</sup>2个剂量上对原发性肝癌大鼠具有治疗和延长生存时间作用,其机制可能是通过抑制VEGF及其受体表达,抑制肝癌血管生成和转移,从而延缓肿瘤扩散进程,改善肝脏功能。

**[关键词]** 双氢青蒿素; 肝癌; 血管内皮生长因子; 肝功能; 生命延长率

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0150-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140150

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1340.018.html>

**[网络出版时间]** 2014-05-28 13:40

## Effect and Mechanism of Dihydroartemisinin on Rats with Primary Liver Cancer

SHENG Qing-shou<sup>\*</sup>, WANG Wu, GUO Hong-wu

(Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the antitumour effect and mechanism of different doses of dihydroartemisinin (DHA) on rats with diethylnitrosamine (DEN)-induced liver cancer. **Method:** One hundred twenty SD rats were randomly divided into the normal group and the model group. The rats in model group were administered DEN intragastrically to induce the liver cancer. Then the 100 modeling rats were divided into 5 groups, 20 rats in each group, DHA high dose group (60 mg·kg<sup>-1</sup>), middle dose group (30 mg·kg<sup>-1</sup>), low dose group (15 mg·kg<sup>-1</sup>), endostar group and model group. The expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the tumor tissue of rat were detected with immunohistochemistry. The expression levels of VEGF, vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) and alpha-fetoprotein (AFP) in the serum of rat were detected by ELISA assay. The indicators of liver function including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and total bilirubin (TBIL) were detected using automatic biochemical analyzer. The overall survival times of remaining rats in each group were recorded, in order to calculate prolonged

**[收稿日期]** 20140125(003)

**[基金项目]** 广西教育厅课题(200911LX229)

**[通讯作者]** <sup>\*</sup> 盛庆寿, 医学博士, 副主任医师, 从事肝胆疾病的中西医结合防治临床与研究, Tel:18376755950, E-mail:397844926@qq.com

survival rate. **Result:** Compared with normal group, the expression of VEGF was decreased obviously in DHA middle and high dose group. The expressions of VEGF, VEGFR-2, AFP in serum were decreased. The survival time of the remaining rats were delayed significantly. The life-prolonging rate was 19.25% and 12.81%. **Conclusion:** DHA at doses of 30 mg·kg<sup>-1</sup> and 60 mg·kg<sup>-1</sup> has therapeutic effects on rats with primary liver cancer and can prolong their survival time. The mechanism may inhibit angiogenesis and metastasis in liver cancer through inhibiting the expression of VEGF and its receptors, thus delaying tumor proliferation process and improving liver function.

[**Key words**] dihydroartemisinin; cancer of the liver; vascular endothelial growth factor; liver function; life-prolonging rate

原发性肝癌按组织学分类可分为肝细胞癌(HCC)、胆管细胞癌和混合型肝癌,其中HCC最为常见,是全球第五大常见肿瘤,死亡率排在第三位<sup>[1]</sup>。肝癌起病隐蔽,大多数肝癌患者确诊时已处于肝癌晚期,已经不能接受外科手术治疗<sup>[2]</sup>。临床上常用的索拉非尼、贝伐单抗、重组人血管内皮抑制素等药物能多靶向的抑制肝癌血管生成而起到一定抑瘤作用。但此类药物的疗效并不持久,存在明显的耐药局限性<sup>[3]</sup>,而且价格昂贵难以普及。因此,寻找更高疗效更易普及的抗癌药物是当前研究的重点。近年的研究发现青蒿素类药物除了抗疟作用外还对多种肿瘤具有抑制作用,且较多涉及到抑制肿瘤的血管生成<sup>[4-6]</sup>。本研究观察双氢青蒿素(DHA)对原发性肝癌大鼠血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF受体-2(VEGFR-2)、甲胎蛋白(AFP)表达及肝功能、生命延长率的影响,并加入重组人血管内皮抑制素作为阳性对照药物,以明确其抗肝癌作用及作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD大鼠120只,雌雄各半,6周龄,体重不低于150g,均购于广西医科大学实验动物中心,许可证号SCXK(桂)2003-0003,饲养于广西中医药大学实验动物中心(SPF级),12h采光,12h黑暗,恒温24℃,相对湿度50%~60%,饲料和水经消毒后使用。实验过程严格遵守动物实验室有关条例。

**1.2 药物与试剂** 双氢青蒿素片(北京万辉双鹤药业有限责任公司,批号070711),重组人血管内皮抑制素注射液(山东先声麦得津生物制药有限公司,批号2009005),二乙基亚硝胺(DEN,美国Sigma公司,批号N-0268,纯度99.9%),羧甲基纤维素钠(天津博迪化工股份有限公司,批号20130303),一抗兔抗血管内皮生长因子(VEGF)抗体(英国Abcam公司,批号AB39256),二抗试剂盒(深圳晶

美公司,批号FA110721),丙氨酸转氨酶(ALT)检测试剂盒(批号CB7114)、天冬氨酸转氨酶(AST)检测试剂盒(批号BG5304)、总胆红素(TBIL)检测试剂盒(批号CF6508)为Dade Behring公司原装配套试剂,大鼠甲胎蛋白(AFP)ELISA检测试剂盒(批号EK0416)、大鼠VEGF ELISA检测试剂盒(批号EK1209)、大鼠血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)ELISA检测试剂盒(批号EK1025)均购于武汉博士德生物公司。

**1.3 仪器** 2010HT型全自动定量酶标仪(郑州博赛生物工程有限责任公司),Olympus显微照相系统(日本Olympus光学公司),Dimension RXL型全自动生化仪(美国德灵公司),AllegraX-22r型低温高速离心机(美国贝克曼康尔特有限公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠原发性肝癌模型建立** 参考相关文献<sup>[7]</sup>,将120只SD大鼠随机分为正常组大鼠20只, DEN造模组大鼠100只。DEN用灭菌自来水配制成质量浓度为95 mg·L<sup>-1</sup>的DEN溶液,供造模组大鼠连续饮用30d后,改饮一般的灭菌自来水30d,再继续饮用95 mg·L<sup>-1</sup>的DEN溶液70d,整个造模时间为130d。正常组大鼠常规饲养。

**2.2 大鼠分组和给药** 造模成功后于d131将原发性肝癌大鼠根据体重、性别分层后随机重新分组,每组20只大鼠。于d132开始用药,分组及给药方法:①正常对照组:生理盐水按1 mL/只ig,每天1次;②模型组:生理盐水按1 mL/只ig,每天1次;③~⑤DHA组,DHA用5%羧甲基纤维素钠按所需浓度混匀,DHA低、中、高剂量组,按DHA 15,30,60 mg·kg<sup>-1</sup>ig,每天1次。⑥恩度组:恩度注射液用生理盐水稀释至0.25%,按5 mg·kg<sup>-1</sup>ip,每天1次,2周1个疗程,停药1周后再继续用,停药期间以生理盐水ig,1 mL/只,每天1次。若大鼠出现出血等副作用时停药1周,症状消失后再继续用药。

**2.3 观察大鼠一般情况** 给药后记录大鼠每天的体征、进食、二便、精神、腹水等一般情况,每周测体重 1 次。

**2.4 取材** 连续给药总计 6 周后所有大鼠停止给药,根据体重、性别分层后各组随机抽取 8 只雌雄各半的大鼠,3% 戊巴比妥 ip 后迅速从腹主动脉取血约 8 mL,分离血清, -80 °C 保存。所取血清做免疫组化法行肝功能检测。同时各肝癌组大鼠取肝右叶相同位置的肝癌组织大小为 1.0 cm × 0.8 cm × 0.3 cm,4% 多聚甲醛固定肝组织作病理切片,免疫组化法检测肝癌组织中 VEGF 表达。

**2.5 免疫组化法检测大鼠肝脏组织 VEGF 表达** 免疫组化检测使用 SABC 法,DAB 显色,操作过程严格按照试剂盒说明书进行。在光学显微镜下观察胞浆中出现棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞,在高倍镜视野(400)下每张切片观察 5 个高倍视野,计数 500 个细胞,以阳性反应细胞所占比例进行半定量分级,阳性细胞 <5% 为阴性(-),5% ~ 15% 为弱阳性(+),16% ~ 50% 为阳性(++), >50% 为强阳性(+++)。

**2.6 检测大鼠血清 VEGF, VEGFR-2, AFP** ELISA 法严格按照试剂盒说明书进行,根据已知对照品浓度及其对应的吸光度值计算检测指标的浓度。

**2.7 检测各项肝功能指标** 肝功能使用全自动生化分析仪测定,严格按照试剂盒说明书进行,测量指标为 ALT,AST,TBIL。

**2.8 记录剩余大鼠生存时间** 采血后记录所剩各组大鼠的总生存时间(正常大鼠除外),以大鼠死亡为观察终点,统计各组大鼠平均生存时间,计算生命延长率。生命延长率 = (治疗组平均生存天数 - 模型组平均生存天数) / 模型组平均生存天数 × 100%

**2.9 数据处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据;采用 Kolmogorov-Smirnov 检验检测数据正态性,Levene 检验检测方差齐性;采用配对资料的 *t* 检验,检测配对资料两组数据的差异;免疫组化数据用秩和检验,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

### 3 结果

**3.1 大鼠一般情况观察** 给药后连续 6 周的观察,各组肝癌大鼠饮食、排泄、精神状态、腹水等一般情况均出现进一步恶化,体重也出现不同程度的降低。其中青蒿素中、高剂量和恩度组的大鼠情况相对缓和,毛色白亮无粪便沾染,腹水阳性比例较低,体重降低比率也低于其余组。取材完毕后记录剩余大鼠的生

存时间,与模型组比较,DHA 中、高剂量组和恩度组的大鼠生存时间明显延长 ( $P < 0.05$ ),生命延长率分别达到 19.25%、12.81% 和 14.19%。低剂量组的大鼠生存时间与模型组比无明显变化。见表 1。

表 1 DHA 对原发性肝癌大鼠生命延长率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	生存时间/d	生命延长率/%
模型	-	24.67 ± 3.23	-
DHA	15	25.25 ± 2.45	2.35
	30	29.42 ± 1.44 <sup>2)</sup>	19.25
	60	27.83 ± 1.34 <sup>2)</sup>	12.81
恩度	5	28.58 ± 1.73 <sup>1)</sup>	15.85

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

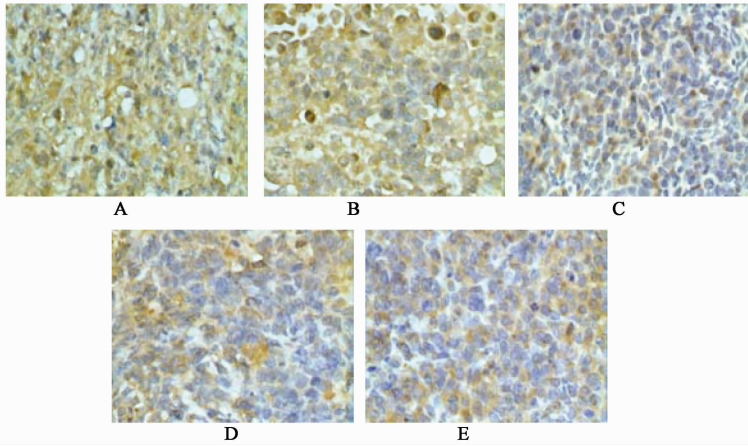
**3.2 对原发性肝癌大鼠肝脏组织 VEGF 的影响** 免疫组化结果显示各肝癌组大鼠均出现了 VEGF 表达阳性,其中大部分模型组标本都表现出强阳性。各给药组中,恩度组、DHA 中、高剂量组的 VEGF 表达较模型组明显降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。且 3 组间比较 VEGF 表达无显著差异。见表 2,图 1。

表 2 DHA 对原发性肝癌大鼠肿瘤组织 VEGF 表达的影响( $n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	VEGF 阳性分级			<i>P</i>
		+	++	+++	
模型	-	0	1	7	-
DHA	15	0	3	5	0.564
	30	3	5	0	0.005 <sup>2)</sup>
	60	3	4	1	0.026 <sup>1)</sup>
恩度	5	2	6	0	0.015 <sup>1)</sup>

**3.3 对原发性肝癌大鼠血清 VEGF, VEGFR-2, AFP 的影响** 各组大鼠经给药治疗后,与模型组比较,DHA 中、高剂量组和恩度组的大鼠血清 VEGF, VEGFR-2, AFP 含量均出现明显降低 ( $P < 0.05$ )。和恩度组比较,这两个剂量组均无明显差异。而 DHA 低剂量组的 VEGF, VEGFR-2, AFP 含量相对模型组差异无统计学意义。见表 3。

**3.4 DHA 对原发性肝癌大鼠肝功能的影响** 与模型组比较,DHA 中、高剂量组和恩度组的大鼠血清 ALT,AST,TBIL 明显低于模型组,DHA 低剂量组的 AST 和 TBIL 也明显低于模型组 ( $P < 0.05$ )。与恩度组比较,中剂量组的 ALT 明显降低 ( $P < 0.05$ ),高剂量组没有差异。见表 4。



A. 模型组;B. DHA 15 mg·kg<sup>-1</sup>组;C. DHA 30 mg·kg<sup>-1</sup>组;D. DHA 60 mg·kg<sup>-1</sup>组;E. 恩度 5 mg·kg<sup>-1</sup>组

图1 各组切片的 VEGF 表达(免疫组化 SABC 法, ×400)

表3 DHA 对原发性肝癌大鼠血清 VEGF, VEGFR-2, AFP 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	VEGF/ng·L <sup>-1</sup>	VEGFR-2/ng·L <sup>-1</sup>	AFP/μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	111.56 ± 8.22	201.73 ± 12.91	1.98 ± 0.83
模型	-	322.90 ± 32.78	321.85 ± 26.28	12.36 ± 0.42
DHA	15	304.19 ± 19.25	290.82 ± 17.84	10.90 ± 0.80
	30	222.00 ± 15.43 <sup>1)</sup>	244.59 ± 14.02 <sup>1)</sup>	7.07 ± 0.87 <sup>2)</sup>
	60	236.06 ± 16.92 <sup>1)</sup>	251.81 ± 13.65 <sup>1)</sup>	7.40 ± 0.15 <sup>1)</sup>
恩度	5	217.15 ± 13.70 <sup>1)</sup>	245.26 ± 14.30 <sup>1)</sup>	6.94 ± 0.14 <sup>1)</sup>

表4 DHA 对原发性肝癌大鼠肝功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	TBIL/μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	44.76 ± 7.10	36.30 ± 4.74	2.76 ± 0.31
模型	-	301.57 ± 76.44	336.13 ± 35.76	13.78 ± 0.83
DHA	15	297.47 ± 49.31	310.10 ± 20.90 <sup>1)</sup>	12.33 ± 0.44 <sup>1)</sup>
	30	136.64 ± 15.52 <sup>2,3)</sup>	133.41 ± 14.05 <sup>2)</sup>	8.52 ± 0.35 <sup>1)</sup>
	60	162.38 ± 19.38 <sup>2)</sup>	148.18 ± 18.10 <sup>1)</sup>	9.59 ± 0.41 <sup>1)</sup>
恩度	5	192.84 ± 27.94 <sup>2)</sup>	158.57 ± 15.77 <sup>2)</sup>	8.79 ± 0.36 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01; 与恩度组比较<sup>3)</sup> P < 0.05。

#### 4 讨论

双氢青蒿素是一种活性较强的青蒿素衍生物,目前合成的青蒿素衍生物还有青蒿琥酯、蒿甲醚、蒿乙醚等。近十余年来,国内外专家研究发现,青蒿素及其衍生物除抗疟作用外,还具有其他药理活性,特别是抗肿瘤作用受到了广泛关注,较多研究认为抗肿瘤血管生成可能是其抑制肿瘤生长的靶点之一<sup>[8]</sup>。笔者前期已开展了青蒿琥酯(体内主要活性成分为DHA)对肝癌H22荷瘤小鼠肿瘤生长、VEGF表达、肿瘤细胞凋亡、生存期的研究,并筛选出了较适宜的治疗剂量(前期研究中青蒿琥酯最佳剂量为45 mg·kg<sup>-1</sup>,根据青蒿琥酯与双氢青蒿素的等效剂

量比为3:2,从而确定DHA分组)<sup>[9]</sup>。加上DHA的毒副作用低,理论上可以作为抗血管生成的分子靶向药物用于中晚期肝癌的长期治疗。本次实验采用原发性肝癌大鼠模型评价DHA的体内抗肝癌作用。对DEN诱导原发性肝癌模型的方法笔者借鉴了相关文献进行改良,极大的降低了大鼠死亡率<sup>[7]</sup>。实验通过测定大鼠血清AFP和肝功能的ALT,AST, TBIL来提示大鼠的肝脏功能与肝癌进程。结果显示DHA在30,60 mg·kg<sup>-1</sup>两个剂量上,相对于模型组,其AFP和肝功能指标都处于较低水平,并且这两个剂量组的肝癌大鼠存活时间明显延长,提示DHA具有延缓大鼠肝癌进程、改善肝脏功能、延长

肝癌大鼠存活时间的作用。

肝癌是典型的富血管肿瘤,血管生成作用在肝癌生长中最为典型<sup>[10]</sup>。肝癌血管生成是一个复杂的过程,涉及多种血管生成调控因子间相互协调<sup>[11]</sup>。VEGF家族是目前发现最重要的一类血管生成调控因子,对血管生成特异性最强,作用最为直接。其家族成员包括 VEGF(即通常所指的 VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E 和胎盘生长因子(Placenta growth factor, PLGF)<sup>[12]</sup>。VEGF受体目前发现有5种,分别是 VEGFR-1(flt-1), VEGFR-2(KDR/flk-1), VEGFR-3(flt-4), 神经毡蛋白-1(NP-1)和神经毡蛋白-2(NP-2)<sup>[13]</sup>。其中 VEGFR-1(flt-1), VEGFR-2(KDR/flk-1), VEGFR-3(flt-4)三者属于酪氨酸激酶受体,VEGF通过受体发挥作用,受体与VEGF的结合后发生自身磷酸化,诱发一系列信号传导,在肝癌的血管生成中起着关键作用<sup>[14]</sup>。随着肝癌进程的发展,VEGF在肝癌患者特别是已转移患者的肿瘤组织和血清中的含量不断增高。在肝癌发展中VEGF通过加速肝癌血管新生、促进金属基质蛋白酶-9(MMP-9)表达、增强NO合酶(NOS)表达等途径加速肝癌细胞浸润、转移。由于VEGF家族在肿瘤血管生成过程中起着重要作用,当前临床上使用的抗血管生成类靶向药物如贝伐单抗、索拉非尼、包括本次研究所使用的恩度都将VEGF作为其中一个干预靶点。本次实验从组织和血清两个层面对大鼠VEGF表达进行检测,结果表明DHA在30,60 mg·kg<sup>-1</sup>两个剂量组能明显降低大鼠的VEGF,VEGFR-2表达,并且和恩度组比较没有显著差异,这提示了DHA能通过抑制原发性肝癌大鼠VEGF,VEGFR-2表达,从而抑制肿瘤血管生成,发挥其抗癌作用。结合DHA低毒、经济的优点,有望被开发为有效的抗肝癌药物。

#### [参考文献]

[1] Huynh H. Molecularly targeted therapy in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(5):550.  
[2] Ji Eun Lee, Si Hyun Bae, Jong Young Choi, et al. Epirubicin, Cisplatin, 5-FU combination chemotherapy in sorafenib-refractory metastatic hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1):235.  
[3] Welker M W, Trojan J. Anti-angiogenesis in

hepatocellular carcinoma treatment: current evidence and future perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(26):3075.

[4] Wang X M, Zhang L, Ding G F, et al. Inhibitory effect of dihydroartemisinin on the growth of human prostate cancer PC-3M cells and its mechanism [J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2012, 18(7):590.  
[5] Aung W, Sogawa C, Furukawa T, et al. Anticancer effect of dihydroartemisinin (DHA) in a pancreatic tumor model evaluated by conventional methods and optical imaging [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(5):1549.  
[6] 姚丽, 谢红, 靳秋月, 等. 利用基因芯片分析二氢青蒿素的抗肿瘤作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(13):1583.  
[7] 杨富春, 郑树森, 蒋天安. 改良法大鼠原发性肝癌模型的建立 [J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(23):2018.  
[8] Yang H, Tan X J. Research advance in antitumor activities of artemisinin and its derivatives [J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2013, 35(4):466.  
[9] 盛庆寿. 青蒿琥酯对 H22 肝癌小鼠的抑瘤作用及对肿瘤组织 VEGF、FasL 的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.  
[10] Yang Z F, Poon R T. Vascular changes in hepatocellular carcinoma [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008, 291(6):721.  
[11] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. *Cell*, 1996, 86(3):353.  
[12] Shahneh F Z I, Baradaran B, Zamani F, et al. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies [J]. *Hum Antibodies*, 2013, 22(1/2):15.  
[13] Hao T, Rockwell P. Signaling through the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-2 protects hippocampal neurons from mitochondrial dysfunction and oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 63:421.  
[14] Zhuang P Y I, Shen J, Zhu X D, et al. Prognostic roles of cross-talk between peritumoral hepatocytes and stromal cells in hepatocellular carcinoma involving peritumoral VEGF-C, VEGFR-1 and VEGFR-3 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e64598.

[责任编辑 聂淑琴]