

华蟾素注射液治疗肝癌的基础和临床研究进展

彭 贝, 巩仔鹏, 陈 涛*

三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

摘 要: 华蟾素注射液是我国自行研制开发的二类新药, 是由中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 皮提取的主要成分经加工制成的水溶性制剂, 具有良好的抗肿瘤作用, 是我国临床中应用较广的抗肿瘤药物, 尤其对肝癌的效果较好。其不仅对多种肝癌细胞有杀伤和抑制作用, 而且许多临床医生发现华蟾素单用及联合介入治疗等手段治疗肝癌均收到良好的效果。对华蟾素抗肝癌的基础和临床最新研究进行综述, 为进一步开发和应用提供参考。

关键词: 华蟾素注射液; 肝癌细胞; 抗肿瘤; 临床应用

中图分类号: R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2011)01-0063-04

Progress in study on basic and clinical application in treating liver cancer by Cinobufagin Injection

PENG Bei, GONG Zi-peng, CHEN Tao

Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: Cinobufacini Injection is the second class new drug independently developed by China, which is water-soluble preparations processed by the main component of *Bufo bufo gargarizans* skin. As a kind of Chinese materia medica with antitumor effect, Cinobufagin Injection is widely used in clinical practice, especially in anti-liver cancer. It could not only inhibit and kill various kinds of hepatoma carcinoma cells, but also be satisfactory effective in treating patients with liver cancer either when applied lonely or together with interventional therapy. This paper will review the latest progress on the basic and clinical application in treating liver cancer of Cinobufagin Injection.

Key words: Cinobufagin Injection; hepatoma carcinoma cell; antitumor; clinical application

华蟾素注射液 (Cinobufagin Injection, 以下简称华蟾素) 是中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 阴干全皮经提取而制成的一种注射用灭菌水溶性制剂, 具有清热、解毒、清肿、止痛等功效^[1-3]。华蟾素通过抑制癌细胞 DNA 和 RNA 的合成, 阻碍细胞的分裂繁殖, 抑制癌细胞生长, 诱导癌细胞凋亡, 参与对癌细胞的直接杀伤, 提高机体免疫力, 能够提高化疗药物的抗癌作用并降低其毒性, 具有良好的抗癌作用, 尤其是治疗肝癌, 在临床上已广泛应用。本文拟对华蟾素抗肝癌的基础和临床最新研究予以综述。

1 基础研究

目前用于实验研究的肝癌细胞株系主要有小鼠 H₂₂ 肝癌细胞和人肝癌细胞, 其中人肝癌细胞主要包括人 HepG2 肝癌细胞、人 BEL7402 肝癌细胞、人 SMMC7721 肝癌细胞。研究发现华蟾素对这些肝癌细胞均具有显著的杀伤作用, 涉及机制较多。

1.1 小鼠 H₂₂ 肝癌细胞

小鼠腹水型肝癌 (H₂₂) 系中国科学院药物研究所于 1963 年以 H₂₂ 实体瘤转变而成的腹水瘤, 一直在昆明种小鼠腹腔内传代, 是国内广泛采用的肝癌细胞株^[4]。

最近的研究发现, 华蟾素可抑制小鼠 H₂₂ 肝癌细胞的生长。赵明芳等^[5]应用小鼠 H₂₂ 肝癌细胞悬液制作 H₂₂ 荷瘤小鼠腹水瘤模型, 分别 ip 给予华蟾素、氟脲嘧啶 (5-Fu)、生理盐水, 计算肿瘤抑制率, 并应用酶化学染色法标记细胞质膜标志酶 (Mg²⁺-ATPase) 和内质网标志酶 (G-6-Pase), 观察华蟾素对肝癌细胞酶活性的变化。光镜下见用药组酶反应颗粒较正常变小, 数量减少, 密度减低, 酶活性降低。证明华蟾素能够降低 Mg²⁺-ATPase、G-6-Pase 的酶活性, 从而抑制肿瘤生长、转移, 达到抗肿瘤作用。

近日, 有学者^[6]发现华蟾素联合光动力学疗法

收稿日期: 2010-10-15

作者简介: 彭 贝 (1991—), 女, 湖北天门人, 三峡大学医学院 2008 级临床医学专业在读本科生

*通讯作者 陈 涛 (1962—), 男, 上海崇明人, 博士, 教授, Tel: (0717)6397378 E-mail: chentao@ctgu.edu.cn

(photodynamic therapy, PDT) 可明显改善 H₂₂ 荷瘤小鼠整体情况, 能明显增强新型光敏剂叶绿素衍生物 (CPD4) 对小鼠移植性 H₂₂ 肝癌细胞的光敏杀伤效应, 这种杀伤作用主要是通过使肿瘤细胞核染色体的崩解来实现的。

1.2 人肝癌细胞

实验中常用的人肝癌细胞主要有人 HepG2 肝癌细胞、人 BEL7402 肝癌细胞、人 SMMC7721 肝癌细胞, 研究发现华蟾素对它们均有较好的抑制作用。

1.2.1 人 HepG2 肝癌细胞 孙宇和陈华等^[7-8]发现华蟾素注射液能够显著抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖, 诱导凋亡, 其抑制效应具有时间和剂量依赖性; 华蟾素注射液作用 HepG2 细胞后部分细胞体积变小, 染色质浓缩边集; 并将 HepG2 细胞阻滞于 S 期; RT-PCR 检测表明, 华蟾素注射液可下调拓扑异构酶 I (Topo I) 的 mRNA 和拓扑异构酶 II (Topo II) 的 mRNA 表达; 对 Topo I 介导的负超螺旋 PBR322 DNA 解旋反应有抑制作用; 对负超螺旋 PBR322 DNA 没有直接抑制作用。说明华蟾素注射液之所以能够抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖, 诱导癌细胞凋亡, 可能主要是通过下调 Topo I、Topo II 表达实现的。

焦敏等^[9]研究发现华蟾素和吉西他滨单药或联合用药可抑制 HepG2 细胞的增殖, 且呈时间与浓度的依赖性。而且还发现华蟾素作用于肝癌 HepG2 细胞 48 h 后, 骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 的表达明显下降, 可以推测, 华蟾素抑制 HepG2 细胞的增殖过程中可能是直接或间接地作用于 OPN, 进而影响相关信号转导通路的调节, 导致肿瘤细胞的增殖延缓和凋亡发生。同时, 与华蟾素单药组相比, 药物联合组 OPN 表达下降更为明显。这可能是由于其与化疗药物合用后产生的化疗增敏作用所致。

1.2.2 人 BEL7402 肝癌细胞 蒋淑莲等^[10]采集健康供者的外周血单个核细胞 (MNC) 培养, 收集非贴壁细胞并加入白细胞介素 2 诱导培养细胞因子诱导的杀伤细胞 (CIKC), 将华蟾素加入 CIKC, 用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测 CIKC 杀伤 BEL7402 肝癌细胞株的活性。发现 CIKC 经华蟾素加入培养后, CIKC 细胞群的 CD3+CD8+, CD3+CD56+ 细胞比例和杀伤活性较单纯的 CIKC 更高。说明华蟾素能增强 CIKC 对 BEL7402 肝癌细胞的杀伤活性。张晨等^[11]观察几种中药注射剂体外对肝癌 BEL7402 细胞的杀伤作用发现华蟾素在高浓度, 一定时间能明显抑制肝癌 BEL7402 细胞增殖, 具有良好的体外

抗肝癌 BEL7402 细胞作用。

1.2.3 人 SMMC7721 肝癌细胞 湛学军等^[12]研究应用鲁米诺 (Luminol) 增强的化学发光 (chemiluminescence, CL) 法检测 SMMC7721 与华蟾素作用 48 h 后的肝癌细胞 CL, 并对药物和瘤细胞作用后的 CL 变化与瘤细胞增殖活性变化的相关性进行分析, 发现华蟾素能够明显抑制肝癌细胞 CL 强度, 且肝癌细胞 CL 强度与瘤细胞的存活率呈正相关 ($r=0.853$, $P<0.01$), 而细胞的 CL 本质上反映了细胞受有丝分裂原或抗原刺激物刺激后活性氧的生成。说明华蟾素能有效抑制 SMMC7721 肝癌细胞增殖。

2 临床研究

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 由于起病隐蔽, 确诊时多已达中晚期, 失去了手术切除治愈的机会, 而目前所用的化疗、放疗、介入治疗仅为姑息治疗, 尚无较为有效的治疗手段。同时肝癌为化疗不敏感肿瘤, 目前化疗药物对肝癌治疗缓解率在 20% 以下, 且因严重的不良反应限制了肝癌的化学治疗^[13]。靶向药物的问世给肝癌治疗带来了希望, 但现在仍未能改变肝癌药物治疗现状, 索拉菲尼等靶向药物在肝癌治疗方面还处于临床试验阶段^[14-15]。探索抗肝癌药物始终是医学关注的热点问题。华蟾素注射液是临床应用广泛的抗肿瘤药物, 抗肝癌作用确切, 临床资料表明总有效率为 44.4%, 且能明显改善生存质量, 是一个有前途的抗肝癌药物, 而且临床研究表明不同的用药途径和方法治疗肝癌均具有良好的疗效。

2.1 单用

华蟾素是一种不良反应小, 对保护肝功能和提高免疫力有一定作用的抗肝癌药物, 已广泛应用于临床。曹宇华等^[16]用华蟾素 20 mL+5% 葡萄糖液 500 mL iv 治疗 32 例肝癌患者, 7 d 后, 改善 10 例, 稳定 15 例, 恶化 7 例, 总有效率为 78.12%, 肝癌的恶化率显著降低。华蟾素能使大多数患者病情稳定, 且对降低血清总胆红素 (TBIL)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 有一定的疗效, 具有一定的保护肝功能的作用。因此, 在对中晚期原发性肝癌的治疗中起到抑制肿瘤生长、提高和改善生存质量、延长生存期的作用。王志超等^[17]采用治疗前后自身对照研究, 35 例病例均为 III、IV 期肝癌患者, 采用华蟾素注射液 30 mL+5% 葡萄糖注射液 500 mL iv 给药。结果使用华蟾素可以改善患者生活质量, 延长生存期, 在控制肿瘤方面, 病情的恶化率较低 (11.4%);

在生存质量方面, 治疗后的总有效率较高(82.86%); 在肝功能方面, 用华蟾素治疗后 TBIL、ALT 等指标明显下降, 与前者的结果近似。孟志强等^[18]的 I 期临床研究初步报道华蟾素最高使用剂量达到常规剂量的 8 倍静脉滴注治疗肝癌时, 尚未出现剂量限制性毒性。王昕等^[19]在临床上对 48 例原发性肝癌患者用华蟾素静脉滴注治疗, 有效率为 50%, 无明显不良反应, 说明华蟾素是安全有效的抗癌药物。刘庆等^[20]临床研究发现原发性肝癌患者的舌质颜色为淡白、青紫, 而经华蟾素治疗后, 由舌诊综合信息分析系统定量分析可知, 患者舌质颜色由淡白青紫向红色转化, 病情好转。

2.2 联合介入治疗

介入治疗的特点是创伤小、简便、安全、有效、并发症少和住院时间明显缩短, 是肝癌最主要的治疗方法之一。用华蟾素介入治疗肝癌取得了良好的疗效, 临床上用不同的用药途径介入治疗肝癌也得到了较好的效果。

2.2.1 单纯介入治疗 华蟾素治疗肝癌与化疗药物的疗效相似, 但其副作用小, 能提高人体免疫力, 因此用于介入治疗治疗肝癌取得了良好的疗效。尤圣勇等^[21]经临床研究认为华蟾素动脉给药联合血管栓塞治疗疗效与化疗药相似, 但对肝功能及骨髓造血影响明显优于常规化疗介入, 可作为不适合肝动脉化疗栓塞术(TACE)或经导管动脉栓塞术(TAE)肝癌患者治疗的一种有效方法。曾柏荣等^[22]用华蟾素经静脉肝动脉序贯给药治疗原发性肝癌患者, 结果近期疗效优于单纯用 TACE 治疗, 并能改善患者生活质量, 提高免疫力。

介入超声治疗肝癌在我国临床治疗肝癌已经很广泛, 谯朗等^[23]实验观察彩超引导下经皮肝穿刺瘤体内注射华蟾素治疗肝癌的疗效。将 28 例肝癌病例分为瘤体内注射华蟾素(研究组 18 例)和瘤体内注射无水乙醇(对照组 10 例), 治疗 2 个月后观察疗效, 统计治疗后瘤体的大小、回声改变及血流指数治疗前后变化。结果研究组效果优于对照组, 主要表现为瘤体缩小更明显, 血流信号减少, 血流指数减低幅度均较对照组大。说明瘤体内注射中药制剂华蟾素的疗效有较好的效果及临床适用性。

2.2.2 联合 TACE 化疗 TACE 为肝癌非手术治疗的主要方法之一。中晚期肝癌患者肝功能状态是影响预后的独立因素, 化疗栓塞术在针对肿瘤的局部治疗的同时却损害了肝功能状态, 导致病人在常规 TACE 后, 几乎都有不同程度的肝功能损害。华蟾

素作为一种低毒、抗癌、对肝功能和免疫有一定保护作用的中药, 与 TACE 联合治疗肝癌有良好的疗效。

陈挺松等^[24]对 16 例确诊为原发性肝癌患者先在数字减影血管造影(DSA)下行超选择性肝动脉化疗栓塞, 术后予护肝等治疗, 1 周内超声引导下经皮肝穿刺门静脉置管持续灌注华蟾素注射液。治疗 3 个月后随访表明近期疗效确切。经治疗后肿瘤完全坏死者 6 例(37.5%), 明显缩小者 5 例(31.25%), 稳定者 2 例(12.5%), 无效 3 例(18.75%)。说明 TACE 联合门静脉置管持续灌注华蟾素注射液治疗能有效灭活和抑制肿瘤, 在原发性肝癌的治疗中具有重要的临床价值。

张一平等^[25]经临床研究发现肝动脉灌注华蟾素联合治疗肝癌患者有效率高达 86.84%, 比单纯用 TACE 效果好, 对改善患者生活质量, 延长生存期有重要意义。薛骞等^[26]研究中晚期肝癌患者接受华蟾素配合 TACE 后机体生存质量及生存率的变化。结果发现华蟾素联合介入治疗可以明显延长患者的生存时间, 提高其生存质量, 改善症状, 效果明显优于单纯介入治疗者。提示华蟾素能够提高 TACE 的治疗效果, 是治疗肝癌的较理想的方法。刘小红等^[27]用华蟾素联合 TACE 治疗中晚期肝癌病人, 发现肝癌栓塞化疗联合华蟾素静脉点滴治疗中晚期肝癌, 不但能提高疗效, 而且能改善机体免疫功能, 是治疗中晚期肝癌较理想的方法。

2.3 联合中药

有时不同的中药联合用药能增强药效减低毒性。邵世祥等^[28]用五倍子散联合华蟾素注射液治疗中、晚期原发性肝癌 51 例, 取得满意的效果, 患者的缓解率、生存质量、症候均较单独用药组有明显的提高和改善。杜志强等^[29]将 40 例拟不能手术的原发性肝癌患者分成对照组和试验组。对照组单纯氩氦刀靶向冷冻消融术, 试验组在氩氦刀术后次日静滴注华蟾素 40 mL/d, 生脉注射液 50 mL/d, 连用 14 d, 4 周为 1 个疗程, 连续治疗 3 个疗程。结果试验组治疗后, 淋巴细胞亚群 CD3、CD4 和 CD4/CD8 比例及 NK 细胞水平较治疗前明显增高($P < 0.05$); ALT、AST、TBIL 和血清白蛋白(ALB)无明显变化。对照组治疗后 T 淋巴细胞亚群 CD3、CD4 和 CD4/CD8 比例及 NK 细胞水平较治疗前无明显变化; ALT、AST、TBIL 升高($P < 0.05$), ALB 降低($P < 0.05$)。对 ≥ 3 cm 的肿瘤 1 年内随访发现, 试验组的复发率为 17.4%, 显著低于对照组的 43.5% ($P < 0.05$)。表明氩氦刀局部消融联合华蟾素和生脉

注射液治疗原发性肝癌可提高机体免疫力, 保护肝脏功能, 降低肿瘤复发率。

3 总结与展望

肝癌的传统治疗方法化疗、放疗对患者肝功能和免疫力有很大的伤害, 因此寻找新的抗癌药物和用药途径已成为当今医学的必要。中药在肝癌治疗中显示的多层次、多途径、多靶点的独特的整合调节作用, 已日益被越来越多的学者认可和重视。其中华蟾素就是一个典型, 作为一种有效的抗癌中药, 具有清热、解毒、止痛、破瘀功效。现代医学发现华蟾素无论是单独应用, 还是与化疗药物、TACE等其他治疗手段联合应用, 在肝癌的治疗方面均显示其良好的效果和独特的疗效。许多基础研究表明华蟾素能抑制多种肝癌细胞增殖, 诱导癌细胞凋亡, 其与化疗药物、TACE等其他治疗手段联用时不仅能增强抗肿瘤作用, 而且副作用较小, 对保护肝功能和提高机体免疫力有较好的作用。

尽管华蟾素在联合治疗肝癌中显示出良好的疗效, 但其联合疗效的机制尚未完全明确, 而且华蟾素注射液本身是一种复合制剂, 含有多种成分, 而究竟是何成分发挥抗肝癌作用, 目前还不得而知。如果能进一步确定其药理活性和作用机制, 加强联合治疗肝癌的研究, 那么势必为其在临床上推广应用用于肝癌的治疗提供更有力的理论依据。

参考文献

- [1] 王婷婷, 徐国兴. 华蟾素的药理作用研究及临床应用进展 [J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(7): 1330-1333.
- [2] 金向群. 蟾蜍化学与药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 1996, 37(4): 246-248.
- [3] 巩仔鹏, 陈涛, 邓李蓉, 等. 华蟾素治疗癌痛的临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 268-271.
- [4] 凌茂英, 刘希凤, 关素琴, 等. 小鼠肝癌细胞系 H22-F25/L 的建立及其生物学特性 [J]. 中华肿瘤杂志, 1991, 13(1): 13-15.
- [5] 赵明芳, 王哲, 魏龙春, 等. 华蟾素对 H₂₂ 荷瘤小鼠肝癌细胞 Mg²⁺-ATP 酶、葡萄糖-6-磷酸酶活性的影响 [J]. 山东医药, 2007, 47(4): 25-26.
- [6] 何登全, 刘向东, 朱曙东, 等. 光动力学疗法联合华蟾素对小鼠移植性 H₂₂ 肝癌超微结构的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(10): 2206-2209.
- [7] 孙宇, 单路娟, 刘越坚, 等. 华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国肿瘤, 2010, 19(6): 410-413.
- [8] 陈华, 孙宇, 崔晓楠. 华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞 DNA 拓扑异构酶 I 的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(3): 197-201.
- [9] 焦敏, 南克俊, 张茜, 等. 华蟾素联合吉西他滨对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用及对骨桥蛋白表达的影响 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31(3): 374-377.
- [10] 蒋淑莲, 文剑, 杜建霞. 华蟾素增强细胞因子诱导的杀伤细胞对肝癌细胞的杀伤活性 [J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(3): 164-166.
- [11] 张晨, 吕书勤, 张亚妮, 等. 几种中药注射剂体外对肝癌细胞 BEL-7402 的杀伤作用 [J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(6): 93-95.
- [12] 湛学军, 张梅, 戴革, 等. 莪术油、华蟾素和 5-氟脲嘧啶对肝癌细胞化学发光的影响 [J]. 实用临床医学, 2008, 9(5): 20-24.
- [13] 孙燕, 石远凯. 临床肿瘤内科手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [14] 周立新, 郭剑民. 肝癌靶向药物治疗的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(2): 156-161.
- [15] Cheng A L, Kang Y K, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebocontrolled trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(1): 25-34.
- [16] 曹宇华, 罗和生. 华蟾素治疗晚期肝癌的临床疗效研究 [J]. 广西医学, 2006, 28(1): 124-125.
- [17] 王志超, 冯正平, 王宏. 华蟾素治疗中晚期肝癌的近期疗效观察 [J]. 现代医院, 2008, 8(6): 56-57.
- [18] 孟志强, 沈晔华, 杨培英, 等. 华蟾素治疗肝癌、肺癌、胰腺癌的 I 期临床研究: 初步报道 [J]. 中国癌症杂志, 2007, 17(5): 376-379.
- [19] 王昕, 苑凤芹. 华蟾素治疗原发性肝癌的临床疗效观察 [J]. 实用中医内科杂志, 2005, 19(4): 379.
- [20] 刘庆, 岳小强, 高静东, 等. 原发性肝癌华蟾素治疗前后舌质颜色的变化 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2005, 11(3): 192-193.
- [21] 尤圣勇, 范晖, 环志根, 等. 华蟾素动脉给药联合血管栓塞治疗中晚期肝癌的临床研究 [J]. 河北医学, 2006, 12(11): 1096-1100.
- [22] 曾柏荣, 何欣, 李平. 华蟾素经静脉、肝动脉序贯给药治疗原发性肝癌临床研究 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(4): 525-527.
- [23] 谯朗, 高俊飞, 李娜, 等. 彩超引导下经皮肝穿刺瘤体内注射中药制剂治疗肝癌的近期疗效观察 [J]. 临床超声医学杂志, 2005, 7(1): 31-33.
- [24] 陈挺松, 吴胜兵, 吴孝雄, 等. 肝动脉化疗栓塞联合门静脉灌注华蟾素注射液治疗原发性肝癌 16 例临床观察 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 792-794.
- [25] 张一平, 许绍雄, 尚国燕, 等. 华蟾素联合化学药物经动脉灌注栓塞治疗原发性肝癌的价值探讨 [J]. 实用放射学杂志, 2005, 21(11): 1187-1189.
- [26] 薛骞, 卢丽琴, 袁国荣, 等. 华蟾素联合 TACE 术治疗中晚期肝癌患者 32 例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2010, 42(2): 22-24.
- [27] 刘小红, 傅浩, 祝强华, 等. 华蟾素注射液联合 TACE 治疗肝癌的临床研究 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(23): 134-135.
- [28] 邵世祥, 王子鑫, 毕磊. 五倍子散配合华蟾素注射液治疗原发性肝 51 例 [J]. 实用中医内科杂志, 2006, 20(1): 93.
- [29] 杜志强, 姜良进, 张宗城, 等. 氩氦刀联合华蟾素和生脉注射液治疗肝癌对机体免疫功能的影响 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(2): 302-304.