

文章编号:1005-6947(2005)07-0497-04

· 实验研究 ·

# 肝癌组织和正常肝组织缺血再灌注损伤的比较研究

赵佐庆, 陈洪茂

(第四军医大学唐都医院 实验外科, 陕西 西安 710038)

**摘要:**目的 比较肝癌和正常肝组织的缺血再灌注损伤。方法 兔肝脏注射 VX2 肿瘤组织混悬液建立肝脏肿瘤, 和缺血再灌注模型。测定再灌注各时点组织中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的含量;用 HE 和 TUNEL 染色观察和比较两种组织的细胞凋亡情况。结果 缺血再灌注后癌组织中的 SOD 浓度下降显著, 于再灌注 1 h 即达最低水平( $64.59 \pm 4.97 \text{ NU/mgprot}$ ), 其后逐渐恢复, 但至再灌注 7 d 仍低于再灌注前( $121.12 \pm 6.88 \text{ NU/mgprot}$ )。与正常肝组织比, 癌组织缺血再灌注后 MDA 的浓度下降, 变化与 SOD 相似; 凋亡细胞数量明显增加, 至 1 d 时达最高水平; 至再灌注 7 d 时阳性细胞仍多于缺血再灌注前, 其凋亡细胞数量多于正常肝组织。结论 癌组织对缺血再灌注的影响和损伤较正常肝组织更为敏感。

**关键词:** 肝肿瘤/血液供给; 肝/血液供给; 再灌注损伤

中图分类号: R735.7; R619.9 文献标识码: A

## Comparative study of the injury to hepatocarcinoma and normal liver tissues following ischemia and reperfusion

ZHAO Zuo-qing, CHEN Hong-mao

(Department of Experimental Surgery, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

**Abstract:** **Objective** To compare the injury to hepatocarcinoma and normal liver tissues following ischemia and reperfusion. **Methods** The hepatocarcinoma (HC) models were established by injectin of VX2 tumor tissue suspension fluid into the left-middle lobe of liver of rabbits. After the models were established, the models left hepatic vessels were occluded for 60 min, then followed by various intervals of reperfusion, and the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured, and apoptotic changes in the hepatocarcinoma and normal hepatic tissues were observed by means of HE staining and TUNEL method. **Results** The concentration of SOD decreased significantly in hepatocarcinoma tissue and reached the lowest point at 1 h after ischemia and reperfusion ( $64.59 \pm 4.97 \text{ NU/mgprot}$ ), then gradually rebounded, but, at 7 d after reperfusion, it still retained at a lower level ( $121.12 \pm 6.88 \text{ NU/mgprot}$ ) than that before reperfusion. In contrast with normal liver tissues, the concentration of MDA decreased in the hepatocarcinoma tissues following ischemia and reperfusion, the changes of MDA were similar to SOD. The apoptotic cells in hepatocarcinoma tissues increased to the highest point at 1 day following reperfusion, but 7 d after reperfusion, the number of positive cells were more than before reperfusion, and the apoptotic rate was higher in hepatocarcinoma tissues compared with the normal liver tissues. **Conclusions** In comparison with normal liver tissue, hepatocarcinoma tissue is more susceptible to the injury of ischemia and reperfusion.

**Key words:** Liver Neoplasms/blood suppl; Liver/blood suppl; Reperfusion Injury

**CLC number:** R735.7; R619.9

**Document code:** A

基金项目:陕西省科技攻关资助项目(2004KB-G10(2))。

收稿日期:2004-12-06; 修订日期:2005-03-05。

作者简介:赵佐庆(1954-),男,山东新泰人,第四军医大学唐都医院教授,主要从事基础外科方面的研究。

通讯作者:赵佐庆 E-mail:zuoqing9218@vip.sina.com。

手术无法切除的肝癌,多采用非手术疗法,如激光、导向、肝动脉结扎、栓塞等非切除性治疗方法。但由于它们对正常组织的损伤和操作的局限性,疗效并不满意。因此,寻找一种操作方便、能有效杀伤癌组织又对正常组织影响较小的治疗方法是许多外科工作者急于探索的课题。缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)常见于血管损伤、组织或器官移植和再植等创伤及外科手术过程中限时阻断器官血流者<sup>[1~4]</sup>。研究<sup>[5,6]</sup>发现,缺血再灌注对肿瘤组织有较好的杀伤作用。提示利用此过程对肿瘤组织可能达到杀伤和治疗的目的。但缺血再灌注对癌组织和正常肝组织损伤有何差异,正常肝组织有无更好的耐受性是需要了解的内容。因此,笔者建立兔肝癌和缺血再灌注模型,研究 IRI 后癌组织和正常肝组织氧自由基的改变和细胞凋亡情况,为创建一种既能增强癌组织的损伤又可减少对正常组织损伤的新的治疗方法打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

纯种成年新西兰大白兔 36 只,雌雄不拘,2.0~2.5 kg,由第四军医大学实验动物中心提供。VX2 瘤株由第四军医大学病理教研室提供。SOD 和 MDA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。采用 721-A 型分光光度计。细胞凋亡测试盒购自美国罗氏公司(Roche Diagnostics GmbH)。

### 1.2 模型制备及动物分组

取 VX2 瘤株组织块混悬液,超声引导下穿刺肝左中叶,缓慢推注 0.5 mL 制作肝癌动物模型。成膜后动物分为缺血再灌注前(对照组,即假手术组)、缺血再灌注后 0 min, 1 h, 1 d, 3 d 和 7 d 共 6 个组,每组 6 只。动物以速眠新肌内注射麻醉(0.15 mL/kg),开腹后找出接种肿瘤组织的肝左叶,分离供应有癌组织的肝左叶肝动脉分支,用无损伤血管钳阻断动脉血流 60 min 后,松开血管钳恢复动脉血流。按各时间点切取肿瘤组织和正常肝脏组织,部分置 -70℃ 冰箱快速冷冻,部分置固定液固定以备 SOD 和 MDA 检测及石蜡切片。

### 1.3 检测项目及方法

1.3.1 SOD 测试 按试剂盒要求,设空白管(不加样本)、测定管(含待测组织匀浆,2.0 mL 75 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 缓冲液,0.2 mL 0.3%

TritonX-100, 0.1 mL 0.98 mmol/L NBT, 0.5 mL 15 mmol/L 盐酸羟胺和 0.1 mL 蒸馏水)及标准管(不加样本,加 0.2 mL 蒸馏水,其余同测定管)。各管振荡混匀,37℃ 水浴 15 min;然后在样品管和标准管内加入 1 mL 甲酸终止反应,充分混匀 590 nm 比色,测 SOD 值。空白调零,按公式计算组织匀浆中 SOD 活力:亚硝酸盐单位(NU)/毫克蛋白数(mgprot) = [2(样品管吸光度 - 标准管吸光度)/标准管吸光度]反应液总体积/(取样量(mL)组织中蛋白含量)。

1.3.2 MDA 测试方法 按试剂盒要求,设空白管、测定管和标准管。各种试剂和反应液充分混匀后,置 80~90℃ 水浴 40~60 min,冷却,3 000 r/min 离心 15 min。取上清 532 nm 比色,测 OD 值。空白调零,按公式计算 MDA 含量:  $C_x = C_{标} F_x / F_{标}$  [  $C_x$  为 10% 样本的 MDA 浓度(nmol/mL);  $C_{标}$  为标准液的浓度(10 nmol/mL);  $F_x$ : 为样品的 OD 值;  $F_{标}$ : 为标准品的 OD 值]。

1.3.3 HE 染色 组织块脱水后石蜡包埋及切片,片厚 5 μm,HE 染色,光镜下观察。细胞核内染色质致密浓缩,核碎裂及出现凋亡小体等为细胞凋亡。连续观察 5 个切片,计算凋亡细胞的百分率。

1.3.4 TUNEL 染色 按照细胞凋亡测试盒的操作流程进行:组织切片二甲苯中脱蜡、经梯度酒精水化、PBS 缓冲液振洗后,以蛋白酶 K 温育 30 min (37℃),再用 PBS 振洗 3 次后,每次 5 min。切片滴加 50 μL TUNEL 反应液,置湿盒内 37℃ 孵育 60 min。PBS 振洗 3 次共 15 min,伊文蓝衬染后,加蛋白甘油液封片,荧光显微镜下观察,照相。胞核内出现黄绿色荧光为阳性细胞。取每个高倍镜视野(200)计数凋亡细胞。除不滴加 TUNEL 反应液外,用同样方法和步骤反应进行阴性对照。组织切片标本上滴加 DNA 酶以裂解 DNA,然后按照 TUNEL 标记步骤依次进行阳性对照。

### 1.4 统计学处理

SOD 和 MDA 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,凋亡数据以中位数( $M$ )与四分位间距( $Q$ )表示,采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,所用统计方法分别为完全随机分组设计的单变量的多组样本均数的两两比较、Dunnett  $t$  检验、Kruskal-Wallis 检验、Mann-Whitney 检验及吸引设计的方差分析。

## 2 结果

### 2.1 正常肝组织和肝癌组织 SOD 及 MDA 改变

2.1.1 正常肝组织 SOD 从再灌注 0 min 下降,其后虽有所恢复,但至 7 d 仍明显低于再灌注前。MDA 浓度以再灌注 0 min 升高最为显著,但持续升高至 7 d。HE 和 TUNEL 染色显示,再灌注 1~3 d 凋亡细胞均有增多,至 7 d 时恢复到再灌注前水平(表 1,2)。

2.1.2 肝癌组织 缺血再灌注后 SOD 和 MDA 含量均有明显改变,且改变规律相似。从缺血再灌注后 0 min 开始, SOD 浓度明显下降,至 1 h 降至最低

点,随后有所回升,但至再灌注 7 d 时仍明显低于缺血再灌注前水平( $P < 0.01$ )。HE 和 TUNEL 染色凋亡细胞变化规律相似,从再灌注 0 min 开始凋亡细胞逐渐增多,至再灌注 1 d 达高峰,7 d 时凋亡细胞仍多于再灌注前(表 1,2,图 1,2)。

### 2.2 肝癌组织和正常肝组织的比较

再灌注前、再灌注后各时点的癌组织 SOD 浓度及其变化程度明显高于正常肝组织。两者 MDA 的改变有明显的差异,其中正常肝组织于再灌注后明显升高,而癌组织中的 MDA 呈下降趋势。癌组织中凋亡细胞的数量明显多于正常肝组织(表 1,2,图 1,2)。

表 1 肝癌组织、正常肝脏组织 SOD 和 MDA 的改变 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	正常肝组织		肝癌组织	
		SOD(NU/mgprot)	MDA(nmol/mL)	SOD(NU/mgprot)	MDA(nmol/mL)
对照组	6	42.00 ± 1.07	18.26 ± 0.43	200.92 ± 26.43	28.41 ± 0.80
0min	6	12.38 ± 0.31 <sup>†</sup>	49.26 ± 1.75 <sup>†</sup>	141.84 ± 16.03 <sup>†</sup>	22.44 ± 1.49 <sup>†</sup>
1h	6	29.78 ± 0.55 <sup>†</sup>	23.85 ± 1.81 <sup>†</sup>	64.59 ± 4.97 <sup>†</sup>	16.59 ± 1.49 <sup>†</sup>
1d	6	23.52 ± 0.58 <sup>†</sup>	26.59 ± 0.65 <sup>†</sup>	140.98 ± 13.93 <sup>†</sup>	21.93 ± 0.36 <sup>†</sup>
3d	6	13.63 ± 0.49 <sup>†</sup>	29.04 ± 1.43 <sup>†</sup>	112.83 ± 5.48 <sup>†</sup>	21.59 ± 0.95 <sup>†</sup>
7d	6	25.78 ± 0.56 <sup>†</sup>	23.00 ± 0.58 <sup>†</sup>	121.12 ± 6.88 <sup>†</sup>	21.85 ± 0.89 <sup>†</sup>

注:† 与对照组比较,  $P < 0.01$

表 2 肝癌组织和正常肝组织的细胞凋亡 [M(Q)]

组别	n	正常肝组织		肝癌组织	
		HE	TUNEL	HE	TUNEL
对照	6	8.5(0.8)	1.0(1.8)	8.0(1.1)	5.0(5.5)3)
0min	6	9.0(1.1)	3.5(2.0)	15.7(2.6) <sup>2),3)</sup>	8.5(4.3) <sup>1),4)</sup>
1h	6	10.4(1.0) <sup>1)</sup>	9.0(4.3) <sup>2)</sup>	15.8(1.0) <sup>2),3)</sup>	21.0(8.0) <sup>2),4)</sup>
1d	6	10.0(0.9) <sup>1)</sup>	15.5(9.3) <sup>2)</sup>	23.1(3.0) <sup>2),3)</sup>	25.5(13.0) <sup>2)</sup>
3d	6	9.5(5.8) <sup>1)</sup>	11.5(5.3) <sup>2)</sup>	13.5(1.1) <sup>2),3)</sup>	19.5(2.5) <sup>2),4)</sup>
7d	6	9.8(1.6) <sup>1)</sup>	2.5(1.5)	14.0(1.6) <sup>2),3)</sup>	8.0(4.3) <sup>4)</sup>

注:与对照组比较, 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$ ; 与正常肝组织同时间组比较: 3)  $P < 0.05$ , 4)  $P < 0.01$

### 3 讨论

缺血再灌注的氧自由基损伤是一个常见的病理过程,任何组织均可发生。有人<sup>[7]</sup>发现,缺血再灌注还与肿瘤的发生发展有关;缺血再灌注后氧化过程中产生的氧自由基对肿瘤组织可产生明显的损伤,最终导致细胞凋亡。由此认为,缺血再灌注除具有组织损伤的不利作用外,对肿瘤组织可能还具有杀伤和治疗作用。有人<sup>[8]</sup>发现,对肝肿瘤的热隔离加缺血再灌注可引起肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )水平的提高,并产生治疗作用。在缺血再灌注的同时给予光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT),通过检测缺血再灌注中具有特异性氧化损伤作用的黄嘌呤氧化酶的改变,认为PDT是以炎性反应对肿瘤进行杀伤的,并观察到缺血再灌注2 h能杀死肿瘤细胞,明显缩小肿瘤的体积而对周围正常组织影响很小<sup>[9]</sup>。间断缺血再灌注或缺血再灌注过程中诱导的中性粒细胞弹性蛋白酶可减少结肠癌的肝脏转移<sup>[10,11]</sup>。

目前对于肝癌的治疗仍以手术为首选方法,但对弥漫性或多发结节型手术切除较为困难。对以侵犯周围组织或转移等复杂型肝癌的治疗有时可采用动脉栓塞结扎等方法,其他还有激光、导向较新型的治疗方法。根据临床观察,上述疗法的应用常因病灶多操作困难及对正常组织的损伤而受到限制。依据IRI的基本理论和目前相关研究,利用IRI干扰和杀伤从而治疗肿瘤成为可能。但在缺血再灌注过程中对癌组织损伤的同时是否对正常组织造成较大的影响、损伤程度有无差别等是解决问题的关键。本研究发现:缺血再灌注前癌组织中SOD水平显著高于肝组织,这可能与癌组织的氧化反应增强及代谢改变和破坏有关。缺血再灌注后癌组织和肝组织中的SOD浓度均有明显改变,而肿瘤组织SOD整体下降水平大于正常肝组织。SOD是一种氧自由基的清除剂,但在清除氧自由基的同时本身得以消耗,氧自由基的增多促进了SOD的消耗。实验中SOD含量的降低即反映了氧自由基的增多和损伤。一般认为,MDA作为氧化反应的终产物缺血再灌注后应该升高。本实验发现肝组织明显升高而癌组织没有升高反而减低,这可能与癌组织病理特点、代谢和反应改变有关。其因果关系尚需进一步研究。

目前认为,缺血再灌注可通过钙超载、炎症反应、氧自由基增多等导致细胞凋亡,而肿瘤的发展

与凋亡有密切关系。本实验除发现兔肝癌缺血再灌注后氧自由基的改变外,HE和TUNEL染色组织切片上也观察到明显的凋亡现象。凋亡细胞表现为染色质浓缩、核碎裂等变化。两种组织的改变规律与SOD和MDA的变化规律相似。虽然两者的凋亡细胞改变有类似的特点,但癌组织的凋亡细胞增多非常显著。本研究提示,缺血再灌注后SOD和MDA的改变反映了氧自由基的损伤作用,细胞凋亡说明了组织和细胞的损伤,其中癌组织的细胞凋亡最为显著,提示癌组织和正常肝组织在缺血再灌注损伤条件下的反应程度有所差异。一般认为,癌组织较为耐缺氧,但再灌注损伤机制不同,可能氧化损伤起到了重要作用。据此,癌组织和正常肝组织对缺血再灌注损伤的反应差异给利用缺血再灌注治疗肝癌带来了希望。然而相关问题还需深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 吕新生,胡国瑛,李小刚,等. 缺血预处理在原发性肝癌切除术中的应用[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(9): 679-681.
- [2] 李文美,陈坚,路遼阳,等. 缺血预处理对肝硬化大白鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(1): 23-25.
- [3] 马驰原,高进喜,包阳晖,等. 兔肝癌缺血-再灌注时Pti-2, Pti-2和phti变化的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2001, 10(4): 331-333.
- [4] 梁法生,宋继昌,高英堂,等. 趋化因子MIP-2在大鼠肝缺血/再灌注损伤后的表达[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(2): 104-106.
- [5] Colston JT, de la Rosa SD, Freman GL. Impact of brief oxidant stress on primary adult cardiac fibroblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(1): 256-262.
- [6] Qin R, Ahmed AS. The effect of ischemic re-perfusion injury plus particle infusion embolism on the apoptosis of rats with pancreatic cancer [J]. Chin Med Sci J, 2001, 16(4): 204-208.
- [7] Li JS, Ren XQ, Liu K, et al. Study on changes of neuron apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion in the aged rat [J]. Ji Jiu Yi Xue, 2004, 16(3): 151-154.
- [8] Aksaz E, Erdem E, Erdem D, et al. TNF-alpha levels in patients with malignant tumors after hyperthermic isolated regional perfusion [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2002, 21(4): 489-493.
- [9] Korbek M, Sun J, Zeng H. Ischaemia-reperfusion injury in photodynamic therapy treated mouse tumours [J]. Br J cancer, 2003, 88(5): 760-766.
- [10] Doi K, Horiuchi T, Uchinami M, et al. Neutrophil elastase inhibitor reduces hepatic metastases induced by ischaemia-reperfusion in rat [J]. Eur J Surg, 2002, 168(8-9): 507-510.
- [11] Yoshida M, Horiuchi T, Uchinami M, et al. Intermittent hepatic ischemia-reperfusion minimizes metastasis in rats [J]. J Surg Res, 2003, 111(2): 255-260.