

文章编号:1005-6947(2007)03-0227-05

· 基础研究 ·

经肝动脉灌注平阳霉素碘油乳剂对兔正常肝脏组织的影响

李枫¹, 徐克², 刘瑞宝²

(1. 大连医科大学附属第一医院介入治疗科, 辽宁 大连 116021; 2. 中国医科大学附属第一医院放射科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨平阳霉素碘油乳剂(PLE)经肝动脉灌注对兔正常肝脏组织的影响。方法 14只4~5个月龄日本大耳白兔,体重(2.5±0.2)kg,按注入生理盐水或PLE的量分为假手术组、实验A组(低剂量组)和实验B组(高剂量组)。各组兔均开腹穿刺肝动脉,按分组剂量注入PLE。术后1,2,4,6周取病理切片,HE染色,光镜下观察肝脏组织学改变;免疫组织化学(免疫组化)染色标记血小板衍化生长因子B链(PDGF-B),并行图象分析。结果 A组HE染色肝细胞呈一过性水样变,变性在2周时最重,至6周已明显减轻。B组HE染色2周时肝细胞明显水样变,4周时可见汇管区纤维组织增生,6周时部分肝组织出现明显假小叶结构。免疫组化染色显示,PDGF-B在肝细胞胞膜及纤维间隔中有明显表达。结论 经肝动脉灌注PLE可导致正常肝脏组织产生不同程度的肝纤维化;PDGF-B参与了肝纤维化的病理过程。 [中国普通外科杂志,2007,16(3):227-231]

关键词: 肝动脉;灌注;局部/副作用;平阳霉素;碘油;肝血管瘤;肝纤维化

中图分类号:R 657.3

文献标识码:A

The effect of hepatic intra-arterial injection of emulsions of lipidol and pingyangmycin on the rabbit normal hepatic tissues

LI Feng¹, XU Ke², LIU Rui-bao²

(1. Department of Interventional Therapy, the First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116021, China; 2. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the effect of hepatic intra-arterial injection of emulsions of lipidol and pingyangmycin (EL + P) on normal hepatic tissues. **Methods** Fourteen big-ear white rabbits were divided into three groups: sham-operation group, A group (low dose of EL + P), and B group (high dose of EL + P). Laparotomy was performed, and various doses of EL + P were perfused into the hepatic artery. Biopsy specimens were obtained on the 1st, 2nd, 4th, and 6th week respectively after the operation. Hematoxylin-eosin stain, immunohistochemistry stain of platelet derived growth factor B (PDGF-B) and quantitative analysis were performed. **Results** The main manifestation of A group was transient hepatocyte hydropic degeneration; in group B the degeneration of hepatocytes was most severe in the 2nd week. Fibrosis appeared in the 4th week, and obvious pseudolobules were formed in some parts of the liver in the 6th week. The expression of PDGF-B was mainly concentrated on the membrane of hepatocytes and fibrotic septum. **Conclusions** Hepatic intra-arterial injection of EL + P can result in damage of normal hepatic tissue. PDGF-B participated in the process of hepatic fibrosis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(3): 227-231]

收稿日期:2006-02-14; 修订日期:2007-03-02。

作者简介:李枫,男,辽宁大连人,大连医科大学附属第一医院主治医师,主要从事肝胆及血管病的介入治疗方面的研究。

通讯作者:李枫 E-mail: lifeng120@263.net。

Key words: Hepatic Artery; Perfusion, Regional/adv eff; Pingyangmycin; Lipidol; Hepatic Hemangioma; Hepatic Fibrosis

CLC number: R 657.3

Document code: A

国内近年已广泛开展经肝动脉插管灌注平阳霉素碘油乳剂 (pingyangmycin lipidol emulsion, PLE) 治疗肝血管瘤的研究。该项治疗为一些巨大肝血管瘤外科手术切除困难的患者及部分不愿手术或不能手术的患者解除了痛苦,开辟了一条治疗肝血管瘤的新途径。但平阳霉素作为一种抗肿瘤抗生素在累计应用到一定剂量后可产生肺纤维化等副作用^[1]。由此,笔者疑及经肝动脉插管灌注 PLE 治疗肝血管瘤是否会对正常肝组织产生影响,是否也会造成肝组织纤维化,目前尚不清楚。本研究旨在通过动物实验模拟肝血管瘤临床介入治疗过程,对上述问题作初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

4~5 个月龄日本大耳白兔 14 只,雌雄不限,体重 (2.5 ± 0.2) kg,由中国医科大学实验动物中心提供。按注入生理盐水或 PLE 的量分组。假手术组:经肝动脉注入生理盐水 0.4 mL ($n = 4$)。实验 A 组(低剂量实验组):0.08 mL 碘油 + 0.3 mg 平阳霉素 + 0.2 mL 生理盐水 ($n = 5$)。实验 B 组(高剂量试验组):0.2 mL 碘油 + 1.2 mg 平阳霉素 + 0.2 mL 生理盐水 ($n = 5$)。

1.2 方 法

1.2.1 实验方法 所有实验兔于术前 24 h 禁食,4 h 禁水。速眠新注射液(长春农牧大学军事兽医研究所)0.8 mL 肌内注射麻醉,腹中线切口长 8 cm。进腹腔后,剪开小网膜(兔体内实际为少量透明系膜组织),于胃幽门上方找到肝门,可见明显的肝动脉搏动,走行朝向肝内,行程中可见其发出胃十二指肠动脉,向幽门部走行(图 1);用 5₂ 头皮针穿刺肝动脉,针头越过胃十二指肠动脉后按上述各组药物和剂量分别给药。拔出针头后用明胶海绵按压 1 min,确定无出血后关腹缝合。术中均严格采用无菌操作。

1.2.2 取材 假手术组、A 组及 B 组共 14 只兔分别于术后 1, 2, 4, 6 周全麻后,于剑突下偏左或偏右处切一长 2 cm 小口,分离肌肉组织,暴露肝脏,观察其大体改变,并于肝表面用手术刀切

取一块约 3 mm × 3 mm 大小的肝组织块,再用 18 G 肝穿刺针于肝脏深处取 2 块组织,明胶海绵按压止血后缝合。取出的肝组织用清水冲洗后立即置福尔马林液固定。

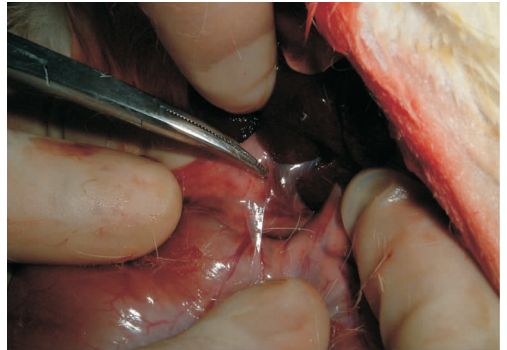


图 1 肝总动脉、胃十二指肠动脉及肝固有动脉腹中线切口于胃幽门上方可见肝总动脉,走行朝向肝内,中途发出胃十二指肠动脉及肝固有动脉(血管钳所指)

1.3 观察指标

1.3.1 肝组织学改变 取材标本采用常规石蜡包埋,5 μm 连续切片,苏木素-依红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色,光镜下观察肝脏组织学改变。

1.3.2 血小板衍化生长因子 B 链 (PDGF-B) 免疫组织化学(免疫组化)染色 采用 ABC 法略加改良(试剂盒购于武汉博士德公司)。常规石蜡脱水;0.2% TWEEN-20 PBS 漂洗;0.4% 胃蛋白酶抗原修复;加入 PDGF-B 一抗抗体;滴加二抗抗体;加 ABC 复合物;DAB 显色(棕黄色);封片。

1.3.3 图象分析处理 使用 MetaMorph/DPI0/BX5 彩色显微图象分析仪进行组织化学定量分析。测定条件:随机选取每张切片 5 个视野,测定其阳性染色(棕黄色)的积分光密度值 (IOD);IOD 值越高表明组织抗原含量越高。取 5 个视野的平均值作为该切片的 IOD 值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件对数据进行统计分析,数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

2 结 果

A 组兔 2 周时取材后死亡 1 只,另补充 1 只(原因考虑为麻醉过量及术后保暖欠佳)。所有实验兔均按照上文实验方法的操作步骤进行。

2.1 肝脏大体观

2.1.1 A组 1周,全组兔肝脏边缘欠锐利;2周,有3兔肝脏部分区域表面覆盖白色被膜,肝缘变钝;4周,5兔肝缘欠锐利,未见白色被膜;6周,大体观与4周相仿。

2.1.2 B组 1周有3兔肝脏被膜颜色变白,全组5兔肝缘欠锐利;2周,5兔肝脏部分区域表面覆盖白色被膜,肝脏明显肿大,肝缘变钝;4周,大体观与2周相似;6周,肝脏部分区域覆盖白色被膜,肝缘钝,肝表面凸凹不平(图2)。

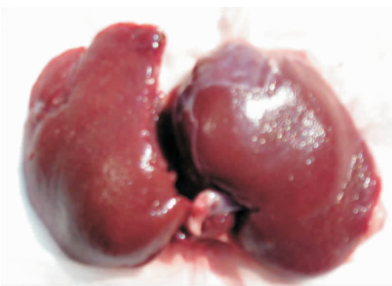


图2 B组6周时肝脏大体观 部分区域覆盖白色被膜,肝缘钝,肝表面凸凹不平

2.1.3 假手术组 肝缘锐利,肝表面光滑,色泽鲜亮。

2.2 光镜下组织学观察3组肝细胞的改变

2.2.1 A组 1周,肝细胞轻度水样变性,汇管区可见淋巴细胞浸润;2周,肝细胞明显水样变

性,汇管区淋巴细胞浸润;4周,肝细胞水样变性减轻,未见纤维化;6周,部分肝细胞仍有肿胀,纤维间隔未见明确增宽(图3)。

2.2.2 B组 1周,肝细胞中度水样变性,肝索拥挤,肝窦充血,汇管区淋巴细胞浸润;2周,肝细胞明显水样变性,胞浆空亮,部分肝细胞可见嗜酸性坏死,呈散在或团片状分布,肝窦充血,汇管区大量淋巴细胞浸润(图4);4周,肝细胞中度水样变性,汇管区可见纤维组织增生,小叶间隔增厚,肝窦充血,部分淋巴细胞浸润;6周,肝细胞轻度水样变性,汇管区纤维组织增生,向小叶内延伸扩展,形成分割包绕趋势,部分肝组织可见假小叶形成(图5)。

2.2.3 假手术组 光镜下肝索排列整齐,小叶结构清晰。

2.3 3组的PDGF-B免疫组化染色结果及IOD值

棕黄色染色为阳性染色。假手术组除汇管区有部分阳性染色外,肝细胞均为阴性染色。A、B组肝细胞胞膜及纤维间隔中有明显阳性和强阳性染色。染色强度随取材时间不同有明显变化(图6)。A组及B组IOD值均在2周达高峰,至6周时明显下降。A组和B组各时点的IOD值均明显高于假手术组($P < 0.01$);B组各时点的IOD值亦明显高于A组(表1)。

表1 各组兔PDGF-B免疫组化染色定量分析(IOD, $\bar{x} \pm s$)

分组	1周	2周	4周	6周
A	88 714 ± 10 115 ^{1),2)}	110 960 ± 9 774 ^{1),3)}	96 435 ± 19 012 ^{1),4)}	74 049 ± 7 503 ^{1),2)}
B	118 714 ± 14 941 ¹⁾	130 399 ± 11 690 ¹⁾	116 594 ± 21 230 ¹⁾	101 732 ± 8 794 ¹⁾
假手术	42 745 ± 871	44 052 ± 1 043	41 081 ± 769	46 366 ± 975

注:1)与假手术组比较 $P < 0.01$;2)与B组比较 $P < 0.01$;3)与B组比较 $0.01 < P < 0.05$;4)与B组比较 $P > 0.05$

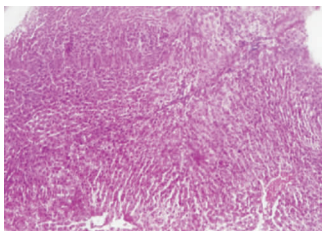


图3 A组6周时未见明显纤维化改变(HE × 100)

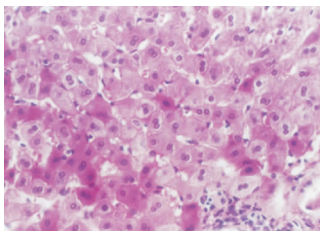


图4 B组2周时的肝细胞明显水样变性,胞浆空亮,部分肝细胞可见嗜酸性坏死,汇管区大量淋巴细胞浸润(HE × 400)

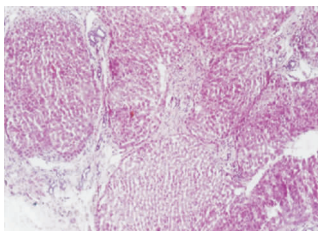


图5 B组6周时的肝细胞轻度水样变性,汇管区纤维组织增生,向小叶内延伸扩展,部分肝组织可见假小叶形成(HE × 100)

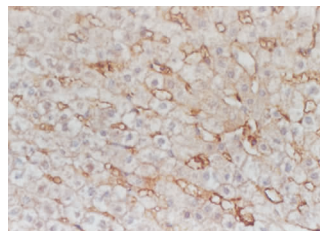


图6 B组肝细胞免疫组化染色所见肝细胞胞膜及纤维间隔中有明显阳性和强阳性染色(ABC × 400)

3 讨论

平阳霉素是从我国平阳地区土壤分离的链霉菌产物,其成分相当于国外产的博莱霉素(bleomycin)A5成分。其主要副作用有发热、胃肠道反应、皮肤反应、肺炎样变或肺纤维化^[1-3]。临床报道当平阳霉素累计用量达到450mg时,30%的患者可致严重肺纤维化。Matalon等^[4]用bleomycin对鼠支气管行一次性灌注,造成鼠肺纤维化。Hay等^[5]研究认为bleomycin对血管内皮存在非特异性抑制和破坏作用,并将这种作用称之为“祛血管作用”。金洪等^[6]通过向大鼠气管内滴注平阳霉素证明其可导致大鼠肺纤维化。曾庆乐等^[7]报道利用平阳霉素与碘油混合乳剂经动脉灌注治疗富血管肿瘤包括肝癌、肝血管瘤及子宫肌瘤等取得良好效果。近几年,有关PLE治疗肝血管瘤,子宫肌瘤的报道越来越多,平阳霉素已经广泛应用于临床介入治疗。但目前用其治疗血管瘤的剂量各家尚无统一标准(一般8~40mg)。对于PLE介入治疗肝血管瘤是否会对正常肝脏组织产生影响,是否也会造成正常肝组织纤维化,目前尚无定论。

介入治疗肝血管瘤的最佳选择是将微导管头端插入血管瘤的直接供血动脉。但有时由于技术原因或患者经济承受能力等因素,目前很多医院仍停留在肝左右动脉甚至肝固有动脉给药。这种给药方式依据的理论是肿瘤的“盗血作用”,即由于肿瘤血供相对于正常肝组织丰富,血管增粗,使得血管阻力压强减小血液优先进入肿瘤的供血动脉。尽管如此仍会有部分碘油混合乳剂随血流进入正常肝组织中,更何况许多肝血管瘤的动脉血供并不丰富,“盗血作用”也不明显。这样会有更多的PLE进入正常肝组织。而究竟这部分PLE会造成肝组织及机体多大损伤,目前尚不明了。

根据Raoul等^[8]研究表明,经肝固有动脉给药,进入原发性肝癌组织内的碘油(T)与进入正常肝组织的碘油(NT)之比(T/NT)为 4.3 ± 2.6 。由于肝海绵状血管瘤是肝实质中异常扩张的血窦,也

是由肝动脉供血,异常的血窦同样缺乏肌层、内弹力层、单核-吞噬细胞系统及淋巴系统。因此可大致认为与原发肝癌的碘油吸收率相近。

由于无法复制肝血管瘤的动物模型,为研究经肝固有动脉灌注PLE治疗肝血管瘤会对正常肝组织产生多大损伤,笔者等根据Raoul等的研究结果设计了2组剂量:A组即目前临床用药的上限,40mg平阳霉素,15mL碘油混合制成混悬乳剂,然后根据兔与人体重公斤比,及动物与人用药剂量换算公式: $D_2 = D_1 \times R_2 / R_1 \times (W_1 / W_2)^{1/3}$ 。(D为动物公斤体重剂量;R为动物体形系数;W为动物体重)。

其中兔体形系数为93,人体形系数为100,人体重按60kg计。算出用药剂量,再根据碘油在肿瘤组织与非瘤正常肝组织的吸收比率(T/NT为 4.3 ± 2.6),取其下限:即 $T/NT = 2$,得出较高剂量组(B组)用药量。同样按照目前临床使用的较常用剂量即16mg平阳霉素,10mL碘油混合,并取T/NT的中间值既 $T/NT = 4$ 得出较低剂量组(A组)用量。将上述剂量分别注入兔正常肝脏中。

本组结果显示PLE对兔正常肝组织可产生的影响:

(1)组织学改变 HE染色光镜下结果显示(B组)中第14天肝细胞变性最重。随时间推移,肝细胞变性在减轻;而纤维化则在第4周出现,至6周部分肝组织形成假小叶结构。A组则呈一过性肝细胞水样变性,2周时变性最重,至6周时细胞变性减轻,未见明确纤维化改变。

(2)PDGF-B免疫组化结果分析 PDGF-B是参与肝纤维化最重要的细胞因子,是促使肝脏纤维化形成的启动因子,其主要作用是促使肝星状细胞(HSC)增殖,促使HSC移行并诱导HSC合成TGF,IGF等细胞因子,引发肝纤维化^[9-10]。本实验通过PDGF-B的免疫组化染色证实PLE介导的肝纤维化也是由PDGF-B启动并参与的。通过组织化学定量分析,可看出PDGF-B最高表达出现在2周,到6周已经有明显下降。抗原表达主要集中在肝细胞膜和纤维间隔中。

(3) PLE 混悬乳剂的配置 经肝动脉灌注 PLE,低剂量组可致肝细胞水样变性;高剂量组可致肝纤维化甚至肝硬化改变。因此应用 PLE 介入治疗肝血管瘤时,为避免正常肝组织损伤,应采用低剂量用药。此外碘油与平阳霉素溶解液的配比也很重要。国内医院的经验是碘油与平阳霉素溶解液按体积比 1.0:1.0~1.5 为宜,其理论依据是该浓度下的混悬乳剂黏滞性低,容易进入肿瘤的供血动脉^[11]。但根据 Thierry de Baere 等^[12]研究表明超液化碘油的混悬乳剂共有 4 种,其 T/NT 值如下:小滴油包水 (small-droplet-water-in-oil) T/NT 为 4.07 ± 1.73 ;小滴水包油 (small-droplet-oil-in-water) T/NT 为 5.02 ± 0.79 ;大滴油包水 (large-droplet-water-in-oil) T/NT 为 10.26 ± 2.88 ;大滴水包油 (large-droplet-oil-in-water) T/NT 为 3.84 ± 0.91 。

进入正常肝组织的混悬乳剂最少的是 large-droplet-water-in-oil,其 T/NT 值为 10.26 ± 2.88 。配制方法是按碘油与平阳霉素溶解液体积比 1.25:1.00 混合,用 2 只 10mL 注射器连接 1 个三通管反复抽吸 20 次后获得。国内报道采用的混悬乳剂形式上属于 large-droplet-oil-in-water,其 T/NT 为 3.84 ± 0.91 。这种混悬乳剂经肝动脉灌注后,进入正常肝组织的量是 large-droplet-water-in-oil 的近 3 倍。因此当采用 PLE 栓塞治疗肝血管瘤时,应采用较低剂量(16mg)的平阳霉素,并按照碘油与平阳霉素溶解液体积比 1.25:1 配置混悬乳剂,以减少 PLE 进入正常肝组织。

综上所述,笔者有如下看法:(1)临床上应用 PLE 栓塞治疗肝血管瘤时,导管头端应超选择进入肿瘤直接供血动脉。(2)如不能超选插管则平阳霉素用量不应超过 16mg,否则有可能造成正常肝组织纤维化;碘油与平阳霉素溶解液的体积

比以 1.25:1.00 为佳。(3) PDGF-B 作为启动因子参与了该纤维化过程。

参考文献:

- [1] 王文锦. 平阳霉素作用机制和临床应用[J]. 中国肿瘤临床, 1992, 19(3):223-224.
- [2] 吴洪斌, 陆国椿. 平阳霉素的不良反应[J]. 中国临床药学杂志, 2001, 10(1):53-55.
- [3] Mir L M, Tounekti O, Orlowski S. Bleomycin: review of an old drug[J]. Gen Pharmacol, 1996, 27(5):745-748.
- [4] Matalon S, Harper WV, Goldinger, JM, et al. Modification of pulmonary oxygen toxicity by bleomycin treatment[J]. J Appl Physiol, 1985 Jun, 58(6):1802-1809.
- [5] Hay JG, Haslam PL, Dewar A, et al. Development of acute lung injury after the combination of intravenous bleomycin and exposure to hyperoxia in rats[J]. Thorax, 1987, 42(5):374-382.
- [6] 金洪, 田庆麟, 姚汉德, 等. 国产平阳霉素诱发肺损伤后的病理与生理改变的初步探讨[J]. 中华病理学杂志, 1992, 21:278-280.
- [7] 曾庆乐, 李彦豪, 陈勇, 等. 平阳霉素碘油乳剂动脉灌注在富血性肿瘤介入治疗中的应用[J]. 介入放射学杂志, 1999, 8(4):213-215.
- [8] Raoul JL, Bourget P, Bretagne JF, et al. Hepatic artery injection of I-131-labeled lipiodol. Part I: Biodistribution study results in patients with hepatocellular carcinoma and liver metastases[J]. Radiology, 1988, 168(2):541-545.
- [9] Alcolado R, Arthur MJ, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Clin Sci (Lond), 1997, 92(2):103-112.
- [10] Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy[J]. J Gastroenterol, 1997, 32(3):424-430.
- [11] 李海平, 曹觉, 雷光武, 等. 平阳霉素碘油乳剂加明胶海绵治疗肝海绵状血管瘤[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(1):61-62.
- [12] De Baere T, Dufaux J, Roche A, et al. Circulatory alterations induced by intra-arterial injection of iodized oil and emulsions of iodized oil and doxorubicin: experimental study[J]. Radiology, 1995, 194(1):165-170.