

文章编号:1005-6947(2008)01-0025-04

· 肝肿瘤专题研究 ·

## 活性氧对兔肝癌组织的作用

赵勇<sup>1</sup>, 赵佐庆<sup>2</sup>

(1. 武警山东消防总队泰安支队医院 外一科, 山东 泰安 271200; 2. 第四军医大学唐都医院 实验外科, 陕西 西安 710038)

**摘要:**目的 研究活性氧对肝癌缺血再灌注(I/R)后的损伤作用。方法 建立兔肝脏肿瘤模型,并于肝缺血再灌注和经门静脉穿刺一次性灌注高氧液(氧分压为80kPa)5 mL后1 h,1 d,3 d和7 d各时点分别取肿瘤组织和肝脏组织,测定超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的含量。用TUNEL染色法观察组织的细胞凋亡情况。结果 单纯I/R后正常肝组织和肝癌组织中的SOD浓度均有明显下降,正常肝脏组织CAT浓度均有所升高,肝癌组织中于再灌注1 d CAT浓度显著降低并达最低水平。恢复血流同时经门静脉灌注高氧液后,正常肝组织及肝癌组织中SOD浓度均较I/R各个时点明显降低,但再灌注7 d时仍低于再灌注前。两种组织中的CAT浓度于I/R 1 h下降达最低,但从再灌注3 d以后,正常肝组织中的CAT浓度回升至正常水平,而再灌注7 d时肝癌组织中的CAT浓度仍处于较低水平。I/R后正常肝组织和肝癌组织的凋亡细胞增多,肝癌组织中细胞凋亡在灌注高氧液后1 d和3 d最为显著。I/R和灌注高氧液后,肝癌组织中SOD和CAT的浓度和凋亡细胞改变均较正常肝组织显著( $P < 0.01$ )。结论 经门静脉灌注高氧液可加强I/R对肝癌组织的氧化改变和损伤,而对正常肝脏组织的影响较小。 [中国普通外科杂志,2008,17(1):25-28]

**关键词:** 肝肿瘤; 缺血再灌注损伤; 超氧化物歧化酶; 高氧液; 活性氧

**中图分类号:** R 735.7; R 364.1

**文献标识码:** A

## Effect of active oxygen on hepatocarcinoma tissues of rabbits

ZHAO Yong<sup>1</sup>, ZHAO Zuoqing<sup>2</sup>

(1. Department of Surgery, Taian Detachment Hospital, Shandong Provincial Fire Fighting Corps, Chinese People's Armed Police Forces, Taian, Shandong 271200, China; 2. Department of Experimental Surgery, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

**Abstract: Objective** To study the injurious effect of active oxygen on hepatocarcinoma after ischemia and reperfusion. **Methods** The models of ischemia and reperfusion (I/R) of hepatocarcinoma were established. The model was reperfused alone or combination with perfused with hyperoxic fluid (Partial pressure of oxygen,  $PO_2 > 80$ ) via portal vein. After reperfusion 1 h, 1 d, 3 d and 7 d respectively, the concentration of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were tested, and the apoptosis of hepatocarcinoma also was observed using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) method.

**Results** The results indicated that the SOD concentration in both hepatocarcinoma tissue and normal hepatic tissues decreased following I/R and perfusion with hyperoxic fluid liquid. The concentration of CAT increased following I/R in normal hepatic tissues. In hepatocarcinoma tissue, concentration of CAT decreased after reperfusion for 1 d and reached its lowest point. After perfusion with hyperoxic fluid, the concentration of SOD in both hepatocarcinoma tissue and normal hepatic tissues decreased more quickly following I/R and the low level was still found on 7 d after reperfusion. The concentration of CAT in tissues of both groups decreased and reached the lowest level at 1 h after reperfusion, but it was restored at 3 d reperfusion in normal hepatic tissues, and in hepatocarcinoma tissue was still at lower level until 7 d after reperfusion. After I/R, the

收稿日期:2007-02-13; 修订日期:2007-07-16。

作者简介:赵勇,男,武警山东消防总队泰安支队医院主治医师,主要从事肝病治疗方面的研究。

通讯作者:赵佐庆 E-mail:zuoqing9218@sina.com

apoptotic cells increased in normal hepatic and hepatic cancer tissues, and were most marked in tissues of hepatic carcinoma at 1 d and 3 d after perfusion with hyperoxic fluid. After I/R and perfusing with hyperoxic fluid, the changes of SOD and CAT and apoptosis in hepatocarcinoma tissue were more obvious than that in normal hepatic tissues ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Perfusion with hyperoxic fluid via portal vein can intensify hepatic ischemia and reperfusion injury, but has less effect on normal hepatic tissues.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1): 25 - 28 ]

**Key words:** Liver Neoplasms; Ischemia-reperfusion Injury; Super-oxide Dismutase; Hyperoxia Liquid; Oxygen Radical

**CLC number:** R 735.7; R 364.1

**Document code:** A

自由基抗癌作用近几年来日益受到关注,人们试图通过提高活性氧的水平治疗肝癌。目前相关体外实验已发现多种提高活性氧水平的方法,包括砷剂等多种化学物质、中药中的姜黄素、丹参、花椒属类等均可促进内源性活性氧的产生。同时还发现,缺血再灌注(ischemia and reperfusion, I/R)也是内源性活性氧和许多活性物质产生的重要途径之一<sup>[1-3]</sup>。活性氧的增多能上调肿瘤坏死因子死亡受体等多种信号激活方式对肿瘤细胞产生损伤和凋亡<sup>[4-5]</sup>。尽管如此,迄今有效的整体抗癌实验还罕见报道。为此,本实验通过肝癌组织 I/R 手段,辅以经门静脉输入高氧液提高局部活性氧含量和增加对组织的损伤,以探讨肝癌的有效治疗方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

纯种成年新西兰大白兔,雌雄不拘,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,由第四军医大学实验动物中心提供。氧化物歧化酶(Superoxid Dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)及脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,采用 721-A 型分光光度计。GY-1 型高氧医用液体治疗仪为西安高氧医疗设备有限公司产品。高氧液的制备按仪器说明书进行,以 3L/min 之氧流量溶于生理盐水并使氧分压达 80kPa 以上。

### 1.2 动物模型、分组及取材

VX2 瘤株组织块混悬液来自 VX2 瘤株传代兔。无菌条件下将瘤株组织剪切成组织块混悬液,穿刺动物肝左中叶缓慢注入 0.5 mL。术后观察 10 ~ 12 d,经超声测得瘤体直径约达 1.2 ~ 2.0 cm,并经其后组织行 HE 染色证实为肝癌组织,即为兔肝脏肿瘤模型建立成功。将荷瘤动物随机分为对照组(无 I/R)和 I/R 后 1 h, 1 d, 3 d 和 7 d 及加氧后 1 h, 1 d, 3 d 和 7 d 共 9 个组。每

组 6 只动物。除对照组动物直接处死切取肝组织和癌组织外,其余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,分离该肝左叶的肝分支动脉,用无损伤血管钳阻断动脉血流 60 min,再灌注组动物松开血管夹恢复动脉血流。加氧组动物恢复动脉血流,同时经门静脉穿刺灌注高氧液 5 mL,关腹。分别于各时点将动物处死,切取肿瘤组织和肝脏组织,置 -20°C 冰箱快速冷冻备用。取部分组织置 4% 多聚甲醛固定以备凋亡检测。

### 1.3 实验方法

1.3.1 SOD 测试方法 用改良的盐酸羟胺法,设空白管(不加样本),标准管(不加样本,加 0.1 mL 蒸馏水,其余同测定管)和测定管(依次加 0.1 mL 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);各管振荡混匀,37°C 水浴 10 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 E560nm 比色,空白调零,测 SOD 值。公式:组织匀浆中 SOD 活力(NU/mgprot) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值)/对照组 OD 值 × 50% × 100%,按公式计算 SOD 含量。

1.3.2 CAT 测试方法 按试剂盒要求,设对照管和测定管,对照管中无标本,测定管加 1% 肝组织匀浆。待各种试剂混匀反应后,于 0.5 光径,405 nm 处空白调零,测其吸光度。按公式组织匀浆 CAT 活力 = (对照管 OD 值 - 测定管 OD 值) × 271 × 1.0 mL/60s × 取样量/1% 匀浆蛋白含量(mgprot/mL)。其定义为每毫克组织蛋白每秒钟分解 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量为一个活力单位。

1.3.3 HE 及 TUNEL 染色 组织常规切片做 HE 染色。TUNEL 染色按试剂盒说明书操作。组织脱水包埋及做厚 3 μm 切片。切片脱蜡水化后依此用蛋白酶 K、内源酶抑制剂、TdT 标记缓冲液孵育。继用标记混合液、TdT 停止缓冲液室温、HRP 及

DAB 反应液室温孵育 2 ~ 10 min。甲基绿复染后脱水透明封片,光镜下观察。同时做无标记、阴性对照和阳性对照实验。评判结果依据棕褐色细胞核为阳性细胞。计数平均 100 个细胞中的着色细胞为阳性细胞率(%)。

#### 1.4 统计学处理

SOD 和 CAT 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,凋亡数据以中位数(M)与四分位间距(Q)表示,采用 SPSS10.0 软件进行统计分析。组间 SOD 和 CAT 比较采用方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验;组间凋亡细胞数据比较采用 Kruskal-Wallis 检验。多重比较采用 Nemenyi 检验;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SOD 和 CAT 浓度测定

单纯 I/R 后的正常肝组织和肝癌组织中的 SOD 浓度均有明显的改变。但 I/R 后正常肝脏组织中 CAT 浓度均有所升高。肝癌组织于 I/R 1 d 时点 CAT 浓度显著降低并达最低水平,从 I/R 3 ~ 7 d 时恢复。经门静脉灌注高氧液后,正常肝组织、肝癌组织中 SOD 浓度在各个时点均明显降低,I/R 7 d 时仍低于再灌注前。两种组织中的 CAT 浓度降低从 I/R 1 h 开始下降并达最低,但从 I/R 3 d 以后,正常肝组织的 CAT 浓度回升至正常水平,而再灌注 7 d 时肝癌组织的 CAT 浓度仍处于较低水平。I/R 和加氧后,肝癌组织中的 SOD 和 CAT 浓度明显低于正常肝组织( $P < 0.01$ ) (表 1)。

### 2.2 癌组织和正常肝组织的细胞凋亡<sup>[6]</sup>

癌组织和正常肝组织 I/R 后,凋亡细胞明显增多。肝癌组织中以 I/R 1 d 时凋亡细胞最多,I/R 7 d 时凋亡细胞仍多于对照组。正常肝组织的凋亡情况也有类似特点,但程度较轻。加氧后,

细胞凋亡进一步加重,以 I/R 1 d 和 3 d 时点凋亡细胞数量最多。肝癌组织的凋亡细胞明显多于正常肝组织,两者差异有统计学意义( $P < 0.01$ ) (表 2) (图 1-2)。

表 1 癌组织、正常肝脏组织的 SOD 和 CAT 改变 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	SOD(NU/mgprot)		CAT (mgprot/ml)	
	正常肝组织	肝癌组织	正常肝组织	肝癌组织
对照	3.18 ± 0.58	3.60 ± 0.45	6.42 ± 0.58	4.17 ± 0.45
I/R				
1 h	1.95 ± 0.41 <sup>1)</sup>	2.99 ± 0.33 <sup>1)</sup>	7.75 ± 0.52	7.92 ± 0.21 <sup>2)</sup>
1 d	1.59 ± 0.10 <sup>1)</sup>	3.31 ± 0.22	7.98 ± 0.12	1.80 ± 0.13 <sup>2)</sup>
3 d	3.25 ± 0.32	2.37 ± 0.54 <sup>1)</sup>	7.50 ± 0.11	6.02 ± 0.43 <sup>1)</sup>
7 d	3.30 ± 0.60	2.50 ± 0.32 <sup>1)</sup>	7.93 ± 0.21	4.55 ± 0.54
加氧				
1 h	1.05 ± 0.32 <sup>2)</sup>	2.24 ± 0.23 <sup>1)</sup>	3.51 ± 0.34 <sup>1),3)</sup>	1.40 ± 0.54 <sup>2),3)</sup>
1 d	1.06 ± 0.12 <sup>2)</sup>	1.55 ± 0.54 <sup>2),3)</sup>	4.70 ± 0.42 <sup>1),3)</sup>	4.40 ± 0.43 <sup>3)</sup>
3 d	3.09 ± 0.65 <sup>2)</sup>	1.18 ± 0.11 <sup>2),3)</sup>	6.10 ± 0.24 <sup>3)</sup>	5.13 ± 0.23
7 d	1.81 ± 0.45 <sup>2),3)</sup>	0.53 ± 0.22 <sup>2),3)</sup>	5.80 ± 0.43 <sup>3)</sup>	2.70 ± 0.17 <sup>2),3)</sup>

注:与对照组比较,1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$ ; 3) 与再灌注组同时点比较,  $P < 0.01$

表 2 癌组织和正常肝组织的细胞凋亡 [M(Q),  $n=6$ ]

组别	癌组织		正常肝组织	
	HE 染色	TUNEL 染色	HE 染色	TUNEL 染色
对照	8.0(1.1)	5.0(5.5)	8.5(0.8)	1.0(1.8)
I/R				
1 h	15.8(1.0) <sup>2),3)</sup>	21.0(8.0) <sup>2),4)</sup>	10.4(1.0) <sup>2)</sup>	9.0(4.3) <sup>2)</sup>
1 d	23.1(3.0) <sup>2),3)</sup>	25.5(13.0) <sup>2)</sup>	10.0(0.9) <sup>2)</sup>	15.5(9.3) <sup>2)</sup>
3 d	13.5(1.1) <sup>2),3)</sup>	19.5(2.5) <sup>2),4)</sup>	9.5(5.8) <sup>2)</sup>	11.5(5.3) <sup>2)</sup>
7 d	14.0(1.6) <sup>2),3)</sup>	8.0(4.3) <sup>4)</sup>	9.8(1.6) <sup>1)</sup>	2.5(1.5) <sup>1)</sup>
加氧组				
1 h	10.8(1.2) <sup>2),3)</sup>	23.0(8.0) <sup>2),4)</sup>	12.4(1.0) <sup>2)</sup>	12.0(4.3) <sup>2)</sup>
1 d	28.1(2.0) <sup>2),3)</sup>	36.5(12.0) <sup>2)</sup>	11.0(0.9) <sup>2)</sup>	13.5(9.3) <sup>2)</sup>
3 d	16.5(2.1) <sup>2),3)</sup>	21.5(2.6) <sup>2),4)</sup>	6.5(5.8) <sup>2)</sup>	15.5(5.3) <sup>2)</sup>
7 d	13.0(2.6) <sup>2),3)</sup>	15.0(3.3) <sup>4)</sup>	8.8(1.6)	6.5(1.5) <sup>1)</sup>

注:1) 与对照组前比较, 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)  $P < 0.01$

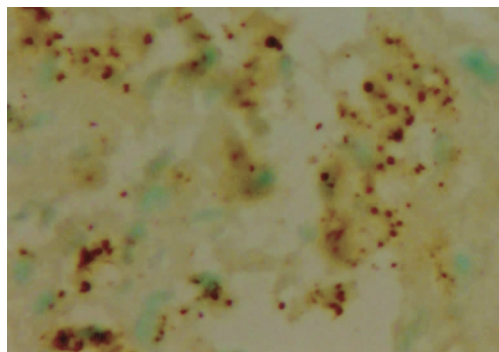


图 1 肝癌组织 I/R 并加氧后 1d 的细胞凋亡 ( $\times 40$ )

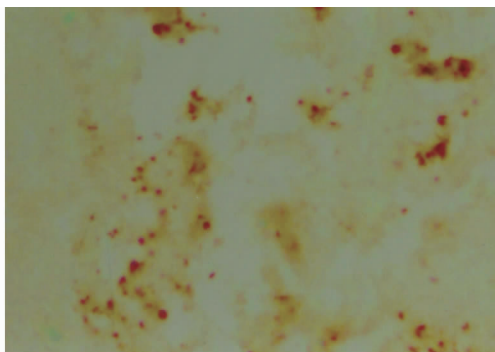


图 2 肝癌组织 I/R 并加氧后 7d 的细胞凋亡 ( $\times 40$ )

### 3 讨论

正常生理状况下,细胞内可产生一定量的活性氧,具有传递生理信号等作用,多余的部分可被自由基清除剂,如SOD和CAT等所清除并保持平衡状态。在特殊情况下,过多的活性氧可造成细胞的损伤。因此目前相关研究的热点是利用一些中药成分和多种化学物质促进肿瘤细胞凋亡。其主要机制均与内源性活性氧的产生,包括上调肿瘤坏死因子死亡受体等信号激活及线粒体放大等有关<sup>[7-9]</sup>。如砷剂、二十五烯酸(EPA)、姜黄素、丹参、花椒属类等<sup>[10]</sup>。现已确认,肿瘤的放射治疗、热疗及新近发展的光动力学治疗等,其基本机制均是通过产生自由基而杀伤肿瘤细胞。I/R过程中能提高动脉氧分压( $\text{ptiO}_2$ )<sup>[2]</sup>、促进活性氧的产生及其抗癌效应也是人们关注的问题。研究<sup>[11]</sup>发现,利用氧自由基对肿瘤组织的氧化作用,尝试通过I/R对肿瘤进行治疗,发现对肝肿瘤的热隔离加I/R后可引起肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平提高,并产生治疗作用。同时还发现,间断I/R或在其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>[12-13]</sup>。

本实验结果显示,单纯I/R后正常肝组织和癌组织中SOD和CTA均有明显降低,提示氧自由基的增多和组织损伤。经门静脉输入高氧液后,SOD及CAT的浓度进一步降低,至I/R 7 d SOD浓度仍保持于较低水平。而CAT的浓度自再灌注1 h开始明显降低且为最低点。有研究<sup>[14]</sup>发现,静脉内输入高氧液后可进一步提高动脉血氧饱和度( $\text{SaO}_2$ )和动脉血氧分压( $\text{PaO}_2$ )。因此分析,在I/R氧自由基增多的基础上,短时间内的低浓度氧输入可能加强了氧爆发的强度,氧自由基产生进一步增多。同时由于SOD在清除大量氧自由基时被消耗,使其浓度也更明显地降低。CAT具有分解 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,减少氧化损伤的重要作用,但在 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的骤然增多情况下CAT也因消耗的增加而浓度降低。HE和TUNEL染色结果表明,单纯I/R可导致正常肝组织和肝癌组织凋亡细胞增多,输入高氧液后凋亡改变得以加强;从I/R 1 h至7 d凋亡细胞明显多于对照组,其中以I/R 3 d最为显著。该结果提示,增加外源性活性氧可明显加强肿瘤细胞的凋亡。

I/R的同时经门静脉输入高氧液后,氧自由基产生进一步增多的程度在正常肝组织和肝癌

组织中也有明显的差别;在多数时点上肝癌组织中的SOD和CAT的浓度及细胞凋亡变化均大于正常肝组织。提示,在I/R基础上辅加强氧化措施可加大组织的氧化损伤,而肝癌组织则更为敏感。因此,可利用此特点对肝癌进行治疗。至于其机制及其他更为敏感的强氧化手段乃是将要深入研究的内容。

#### 参考文献:

- [1] 赵佐庆,陈洪茂. 肝癌组织和正常肝组织缺血再灌注损伤的比较研究[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(7): 497-500.
- [2] 马驰原,高进喜,包阳辉,等. 兔肝癌缺血-再灌注时 $\text{PtiO}_2$ ,  $\text{PtiCO}_2$ 和 $\text{pHti}$ 变化的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2001, 10(4): 331-333.
- [3] 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.
- [4] Amann B, Hanson MS, Hatch E. Quantification of basal and stimulated ROS levels as predictors of islet potency and function[J]. Am J Transplant, 2007, 7(1): 38-47.
- [5] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps[J]. J Cell Biol, 2007, 176(2): 231-241.
- [6] 张岚,杨侠,杨宪法. 缺血再灌注对肝癌组织及正常肝组织的损伤[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(8): 783-785.
- [7] Chang B, Nishikawa M, Nishiguchi S, et al. L-carnitine inhibits hepatocarcinogenesis via protection of mitochondria[J]. Int J Cancer, 2005, 113(5): 719-729.
- [8] Neuman, M G. Apoptosis in diseases of the liver[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2001, 38(2): 109-166.
- [9] Trueba GP, Sanchez GM, Giuliani A. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer[J]. Front Biosci, 2004, 1(9): 2029-2044.
- [10] Junq EM. Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5) [J]. Crcoinogenesis, 2005, 26(11): 1905-1913.
- [11] Akasaz E, Erdem E, Erdem D, et al. TNF- $\alpha$  levels in patients with malignant tumors a hyperthermic isolated regional perfusion[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2002, 21(4): 489-493.
- [12] 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.
- [13] Yoshida M, Horiuchi T, Uchinami M, et al. Intermittent hepatic ischemia-reperfusion minimizes metastasis in rat[J]. J Surg Res, 2003, 111(2): 255-260.
- [14] 刘坤,蔺锡侯. 高渗氯化钠高氧液对失血性休克家兔血乳酸和动脉血气的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(4): 277-281.