

文章编号:1005-6947(2007)08-0783-03

· 基础研究 ·

## 缺血再灌注对肝癌组织及正常肝组织的损伤

张岚<sup>1</sup>, 杨侠<sup>2</sup>, 杨宪法<sup>2</sup>, 赵佐庆<sup>3</sup>

(1. 解放军第三医院 理疗科, 陕西 宝鸡 721004; 第四军医大学唐都医院 2. 教务科 3. 实验外科, 陕西 西安 710038)

**摘要:**目的 研究缺血再灌注(IR)对肝癌和正常肝组织的损伤作用。方法 超声引导穿刺新西兰兔肝脏左中叶注射 VX2 肿瘤组织混悬液, 建立肝脏肿瘤模型。2 周后, 证实荷瘤模型已成功构建, 乃剖腹阻断肝左中叶的肝动脉分支, 60 min 后去除血管阻断恢复血流; 分别于再灌注 0 min, 1 h, 1 d, 3 d 和 7 d 取肝癌组织和正常肝组织石蜡包埋切片, 以 HE 染色法和荧光脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 法观察两种组织细胞凋亡情况。结果 HE 染色显示, IR 后两种组织的凋亡细胞均有增加。至 1 d 时凋亡达峰值(肝癌为 23%, 正常组织为 10%), 其后虽有降低, 但至 7 d 时仍明显高于 IR 前水平( $P < 0.01$ )。以癌组织细胞凋亡最为显著, 其在各时点阳性细胞率均明显高于正常肝组织。TUNEL 实验显示, IR 前癌组织凋亡细胞(5%)即多于正常肝脏组织(1%)。IR 后, 癌组织和正常肝组织凋亡改变的特点与 HE 染色相似, 于 IR 1 d 和 7 d 凋亡细胞率分别为 25%, 15% 和 8%, 2%。结论 IR 后肝癌组织的损伤和细胞凋亡较正常肝组织更为显著。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(8): 783-785]

**关键词:** 肝肿瘤; 缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; 疾病模型, 动物; 兔

**中图分类号:** R 735.7; R 364.1

**文献标识码:** A

## The effect of ischemia and reperfusion injury to hepatocarcinoma and normal liver tissues

ZHANG Lan<sup>1</sup>, YANG Xia<sup>2</sup>, YANG Xian-fa<sup>2</sup>, ZHAO Zuo-qing<sup>3</sup>

(1. Department of Physiotherapy, the Third PLA Hospital, Baoji, Shanxi 721004, China; 2. Division of Teaching Service 3. Division of Experimental Surgery, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of ischemia and reperfusion injury to hepatocarcinoma and normal liver tissues. **Methods** The hepatocarcinoma animal models were established by the ultrasonography-guided implantation of VX2 tumor tissue suspension into the left-middle lobe of liver of rabbits. Two weeks later, the established hepatocarcinoma animal modal and the control group animal were subjected to 60 minutes clamp of the left-middle lobe artery branch followed by reperfusion at 0 min, 1 h, 1 d, 3 d and 7 d respectively. Apoptotic changes in the hepatocarcinoma and normal hepatic tissues were observed by means of HE staining and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL).

**Results** The result of HE staining indicated that the number of apoptotic cells in hepatocarcinoma and normal liver tissues increased to the highest point 1 d following reperfusion (23%, 10%), but even though the positive cell count decreased to a certain extent until 7 d after reperfusion, it was still more obvious than that before the reperfusion. The positive apoptosis ratio of hepatocarcinoma tissue retained a higher level than that of normal liver tissues at all time points. The result of TUNEL showed that the number of the apoptotic cells in hepatocarcinoma tissues (5%) was larger than that of normal liver tissues before ischemia (1%). The apoptotic characteristics of hepatocarcinoma and normal liver tissues after reperfusion were similar to those of HE staining and their apoptotic ratio was 25%, 15% and 8%, 2% after reperfusion for 1 d and 7 d respectively. **Conclusions** Ischemia and reperfusion can cause more intense injury and apoptosis in hepatocarcinoma tissue than in normal hepatic tissues.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(8): 783-785]

收稿日期: 2007-03-05; 修订日期: 2007-07-30。

作者简介: 张岚, 女, 山东烟台人, 解放军第三医院副主任医师, 主要从事康复理疗方面的研究。

通讯作者: 张岚 E-mail: junhaolai@sina.com

**Key words:** Hepatocarcinoma; Ischemia and Reperfusion Injury; Apoptosis; Disease Model, Animal; Rabbits

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

**Document code:** A

缺血再灌注(ischemia and reperfusion, IR)损伤与氧自由基、钙超载、炎性反应及细胞凋亡等有关。近年来还发现,IR配合相关手段可杀伤肿瘤组织<sup>[1-2]</sup>。但对于IR对正常组织的影响,是否可利用IR的组织损伤作用对肝癌进行治疗?尚不明了。为此,本实验建立肝癌和IR模型,以HE染色和荧光脱氧核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)观察G肝癌组织和正常肝组织细胞IR前后的凋亡情况,旨在探讨肝癌IR的损伤规律,为寻找一种能杀灭肿瘤细胞又能保护正常组织的治疗肝肿瘤新方法建立基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验动物:纯种成年新西兰大白兔36只,雌雄不拘,体质量2.0~2.5kg,由第四军医大学实验动物中心提供。主要试剂:细胞凋亡测试盒购自美国Roche Diagnostics GmbH公司。VX2瘤株由第四军医大学病理学教研室提供,采用新西兰兔活体传代。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 肝癌IR模型的建立** 取VX2瘤株传代兔,处死,无菌条件下取其股部肌肉内的肿瘤组织,置于平皿中;加入生理盐水剪切并制成组织混悬液,吸入20mL注射器内备用。超声引导下穿兔刺肝左中叶,缓慢推注0.5mL肿瘤组织混悬液于左中叶,制作肝癌疾病模型。2周后超声判定动物的疾病模型,兔肝VX2肿瘤接种成功在超声表现为低回声伴声晕的肿块,彩色多普勒血流成像表现为周边血供丰富,中央血供稀少。荷瘤动物以速眠新肌肉注射麻醉(0.15mL/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分支动脉,用无损伤血管钳阻断动脉血流60min后,松开血管夹恢复动脉血流后关腹,于IR前、IR后0min,1h,1d,3d和7d等不同时点动物处死,分别切取癌组织和距癌结节1.5cm外的正常肝组织,置固定液中以备石蜡切片。

**1.2.2 HE染色** 组织块脱水后石蜡包埋及切片,片厚5 $\mu$ m,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,计算凋亡细胞的比率。同时,对肝癌与正常肝组织作出对应的病理诊断。

**1.2.3 TUNEL标记** 按照细胞凋亡测试盒的操

作流程进行:组织切片在二甲苯中脱蜡,经梯度酒精水化,磷酸盐缓冲液(PBS)振洗后,以蛋白酶K温育30min(37 $^{\circ}$ C),再用PBS振洗3次,每次5min。切片滴加50 $\mu$ L TUNEL反应液,置湿盒内37 $^{\circ}$ C孵育60min。PBS振洗3次共15min,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( $\times 200$ )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。

### 1.3 统计学处理

数据以中位数(四分位数间距)(M(Q))表示。采用SPSS10.0软件进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 观察两组细胞凋亡情况

在HE染色切片上,凋亡细胞表现为体积缩小、胞核染色质浓缩、边集、碎裂成小颗粒样。IR后肿瘤组织凋亡细胞明显增加。从IR0min开始凋亡细胞逐渐增多,至IR1d达高峰( $P < 0.05$ ),其后又减少,但7d后仍高于IR前水平。正常肝组织从IR1h~7d后凋亡细胞有所增加,但均明显少于肝癌组织( $P < 0.01$ )(附表)。

### 2.2 TUNEL检测

TUNEL染色阳性细胞为肝细胞和部分库普弗细胞,阳性产物为细胞核内呈现黄绿色的荧光物质。IR后癌组织和正常肝组织的阳性细胞改变规律与HE染色相似,癌组织的凋亡细胞亦明显多于正常肝组织(附表)。

**附表** 肝癌组织和正常肝组织的细胞凋亡情况 [M(Q),  $n = 6$ ]

组别	肝癌组织		正常肝组织	
	HE染色	TUNEL染色	HE染色	TUNEL染色
IR前	8.0(1.1)	5.0(5.5)3)	8.5(0.8)	1.0(1.8)
IR后				
0min	15.7(2.6) <sup>2),3)</sup>	8.5(4.3) <sup>1),4)</sup>	9.0(1.1)	3.5(2.0)
1h	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>
1d	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>
3d	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>
7d	14.0(1.6) <sup>2),3)</sup>	8.0(4.3) <sup>4)</sup>	9.8(1.6) <sup>2)</sup>	2.5(1.5)

注:与IR前比较:1) $P < 0.05$ ,2) $P < 0.01$ ;与正常肝组织同时点组比较:3) $P < 0.05$ ,4) $P < 0.01$

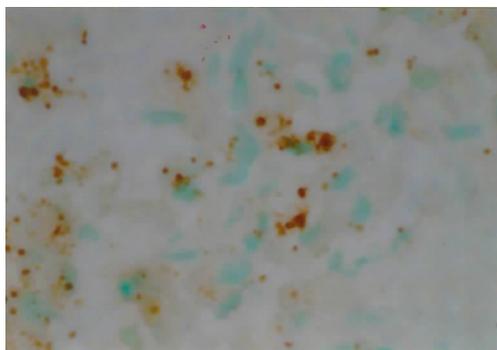


图1 肝癌组织 IR 后 1d 细胞凋亡(TUNEL ×40)

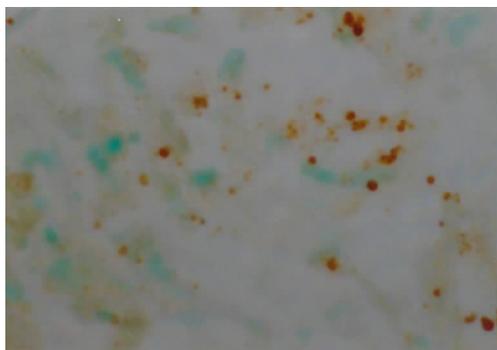


图2 肝癌组织 IR 后 7d 细胞凋亡(TUNEL ×40)

### 3 讨论

对于手术切除困难的肝癌患者常采用肝动脉结扎或栓塞等方法治疗,但因其具有对正常肝组织的损伤,使其在多发性结节、弥漫性病变等复杂情况下的可操作性、治疗效果及对肝功能的影响等方面均有明显的缺点。有学者<sup>[3]</sup>发现,用热隔离加 IR 后可引起肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平提高,并产生对肝肿瘤的治疗作用。在 IR 的同时给予光动力学疗法 (photodynamic therapy, PDT), 通过检测 IR 中具有特异性氧化损伤作用的黄嘌呤氧化酶的改变,发现 PDT 是通过炎性反应对肿瘤进行杀伤的,并观察到 IR 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>[4]</sup>。同时还发现,间断 IR 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>[5-6]</sup>。

目前认为,IR 可引起氧自由基的改变和组织损伤,三磷酸腺苷(ATP)合成减少、pH 异常、细胞膜通透性增加及儿茶酚胺增多等均可引起细胞内钙粒子( $\text{Ca}^{2+}$ )稳态调节的破坏,从而造成钙超载,而钙超载又可进一步加重细胞损害。IR 过程中的缺血、缺氧和组织坏死产物等的刺激均可诱导炎症介质的产生(包括活性氧、促炎细胞因子、炎症趋化因子等),导致局部变化即炎症反应。目前认为,激活的炎症细胞,主要是白细胞,可在 IR 过程中起机械阻塞和对组织的损伤作用。研究证明,氧自由基增多、钙粒子超载及炎症反应均可诱导细胞凋亡。化疗和放疗对肿瘤细胞杀伤作用也是通过凋亡实现的。在以往的大白兔肝癌 IR 实验研究中,笔者发现,能反映氧自由基损伤的超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)及丙二醛(MDA)均有明显改变,提示存在自由基的改变和组织损伤<sup>[7]</sup>。HE 染色组织切片上观察到明显的凋亡改变。癌组织从 IR 0 min 开始凋亡已很明显,至 1 d 达最高峰,7d 时细胞凋

亡仍很明显。TUNEL 实验进一步显示肝癌组织缺血 IR 后的凋亡改变,其变化规律与 HE 染色相似但更为精确,所显示的凋亡细胞更多。笔者在氧自由基的研究中已发现癌组织的改变强于正常肝组织,而凋亡细胞也具此特点<sup>[7]</sup>。本研究的 HE 染色和 TUNEL 实验结果均显示,在 IR 各时点肝癌组织凋亡细胞率明显大于正常肝组织。分析两者间的差异可能与癌组织的特点有关,如代谢改变、氧消耗增多及其引发的氧化损伤增强等。IR 对肝癌组织的损伤特点提示,利用 IR 对弥漫性、多发性和复杂型肝癌进行治疗可能具有较好的效果。但对于 IR 的强度和条件等相关内容还需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Baltalaril A, Ozcan V, Ferda B. Ascorbic acid (Vitamin C) and iloprost attenuate the lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities of rats [J]. *Ann VasSury*, 2006, 20(1): 49-55.
- [2] Jin Q, Kang C, Soh Y, et al. Tetrandrine cytotoxicity and its dual effect on oxidative stress induced apoptosis through modulating cellular redox states in Neura mouse neuroblastoma cells [J]. *Life Sci*, 2002, 71(17): 2053-2066.
- [3] 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.
- [4] Korbelik M, Sun J, Zeng H. Ischaemia-reperfusion injury in photodynamic therapy treated mouse tumours [J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(5): 760-766.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Chen HM, Zhao ZQ, Lu FQ. Changes and significances of SOD and MDA after ischemia reperfusion injury of hepatic neoplasm [J]. *J Med Colleges of PLA*, 2003, 18(3): 203-204.