维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0612－03

经肝动脉灌注三氧化二砷对肝移植瘤线粒体的作用

郑明友，吴诚义

(重庆医科大学临床学院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨经肝动脉灌注 As_2O_3 对肝移植瘤线粒体的作用。方法:采用新西兰大白兔建立肝脏 Vx－2 移植瘤模型 50 只,随机平均分成 5 组。移植瘤术后 2 周,每天经肝动脉插管灌注药物,连续 7 天,6 周末取肝肿瘤和邻近的正常肝组织,电镜观察肿瘤组织线粒体改变并行线粒体比表面积定量分析,同时观察肿瘤组织的凋亡改变。结果:实验组肝移植瘤细胞线粒体发生不同程度肿胀、固缩,实验组肿瘤细胞线粒体改变的只数高于阴性对照组、阳性对照组,差异具有显著性,并与 As_2O_3 的剂量相关($P<0.01$)。实验组肿瘤细胞的线粒体比表面积与阴性对照组、阳性对照组间,实验组组间以及同一实验组内肿瘤细胞与肝细胞比较差异都具有显著性($P<0.05$)。肿瘤细胞的线粒体的改变与凋亡的产生具有一致性。结论:经肝动脉灌注 As_2O_3 对肝移植瘤细胞线粒体具有选择性损伤作用,并存在剂量效应相关性。

【关键词】三氧化二砷;动脉灌注;肝脏;移植;肿瘤;线粒体;兔

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－01－14

The effect of arsenic trioxide(As_2O_3) on mitochondria of hepatic Vx－2 carcinoma in rabbits by transcatheter arterial infusion

ZHENG Mingyou, et al

(*Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the action of arsenic trioxide(As_2O_3) on mitochondria of hepatic Vx－2 carcinoma by transcatheter arterial infusion(TAI). *Methods*: Fifty New Zealand rabbits weighing 2－3kg with hepatic Vx－2 carcinoma were randomly divided into five groups evenly. Two weeks after the tumor was implanted, the rabbits were treated with As_2O_3 (experimental groups), cisplatin or normal saline(control groups) by TAI for 7 days consecutively. Three weeks after drug administration, the mitochondrial morphological changes and mitochondrial specific surface areas of the tumor and hepatic tissues were investigated under transmission elcetron microscope, at the same time apoptosis of the tumor was observed. *Results*: The mitochondrial morphological changes of tumor were obvious in the experimential groups as compared with control groups($P<0.01$). The mitochondrial specific surface area of tumor cells was significantly different among the experimental groups and control groups($P<0.05$). They were also significantly different among experimental groups or between tumor cells and hepatic cells in the same experimental groups($P<0.05$). Mitochondria changes of the tumor was consistent with the generation of its apoptosis. *Conclusion*: The results show that As_2O_3 by TAI can damage the mitochondria of tumor cells selectively, and the effect is dose dependent.

【Key words】Arsonic trioxide; Transcatheter arterial infusion; Liver; Implantation; Tumor; Mitochondrion; Rabbit

众多实验研究[1~3]证实线粒体是砷剂作用最敏感的细胞器,三价砷消耗线粒体内亲水性巯基,诱导细胞产生活性氧类(reactive oxygen species, ROS),降低 NAD(P)H 水平,引起维持线粒体功能所必需的线粒体跨膜电位(mitochondrial transmembrane potential, MTP)降低,干扰线粒体能量代谢,导致线粒体形态和功能的改变,位于线粒体内外膜间的一系列凋亡因子释放,随后引起级链式的凋亡反应及肿瘤细胞死亡。故测定线粒体的变化也可用于检测 As_2O_3 诱导凋亡的作用。本实验拟经肝动脉灌注不同浓度如 As_2O_3 治疗兔肝脏 Vx－2 移植瘤,通过定量形态学研究,探讨 As_2O_3 对肝脏肿瘤细胞线粒体的作用。

1 材料和方法

作者介绍:郑明友(1966－),男,副主任医师,硕士,主要研究方向:肝胆胰外科基础与临床研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 实验对象

纯种、清洁新西兰大白兔 50 只，由重庆医科大学实验动物中心提供动物，合格证号：SCXK(渝)20020001，雌雄不分，3～4 月龄，体重 2～3kg。

1.2 实验材料

1%亚砷酸注射液(购自哈尔滨伊达制药厂)、2%顺铂注射液(购自昆明三成贵金属药业公司)。皮下 Vx－2 移植瘤种兔由重庆医科大学超声工程研究所提供。肝动脉插管购自 BD(美国)公司。

1.3 实验方法与分组

将靠近 Vx－2 移植瘤种兔肿块边缘生长旺盛的鱼肉样组织切成 1～2mm^3 瘤块，将肿瘤块植入肝左前叶内。根据重庆医科大学超声生物工程研究所经验，两周后肝脏上将形成一直径约 1cm 浸润性生长的肿瘤。肝脏移植瘤术后的第二周末，在肝动脉根部穿刺置管并固定。

随机将实验动物平均分成 5 组(每组 10 只动物)：阴性对照组(生理盐水)、阳性对照组(顺铂 1.28mg/(kg.d))、实验组 1(As_2O_3 0.6mg/(kg.d))、实验组 2(As_2O_3 1.2mg/(kg.d))、实验组 3(As_2O_3 1.96mg/(kg.d))。每天经肝动脉插管灌注实验用药(生理盐水稀释至 10ml)1 次，连续 7 天。肝脏移植瘤术后第 6 周末后，取肝癌组织和邻近(1.5cm)肿瘤相同部位的正常肝组织电镜标本各 1 份。

1.4 观察指标

透射电镜观察：肿瘤细胞、肝细胞的线粒体改变，采用北航 CM－2000B 型生物医学图像分析系统，计算线粒体比表面积。线粒体比表面积表示单位结构体积所具有的表面积[4]。观察肿瘤组织的凋亡形态学改变。

1.5 统计学分析

用 SAS 8.1 统计学软件对所得数据进行 q 检验、趋势检验，$P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结 果

2.1 对移植瘤组织线粒体的影响

实验组肿瘤组织中可见实验组 1 线粒体肿胀 6 只，实验组 2 线粒体肿胀 9 只，实验组 3 线粒体固缩 7 只(图 1－4)。实验组肿瘤细胞线粒体改变的只数高于阴性对照组(1 只)、阳性对照组(3 只)，差异具有显著性($P<0.01$)。随着 As_2O_3 用药剂量的增加，实验组内线粒体损伤的只数也随之增加($P<0.01$)。各组线粒体比表面积比较见表 1。经 q 检验显示实验组分别与阴性对照组、阳性对照组相比，实验间以及同一实验组肿瘤细胞与瘤旁肝细胞的线粒体比较其差异均有显著性($P<0.05$)。

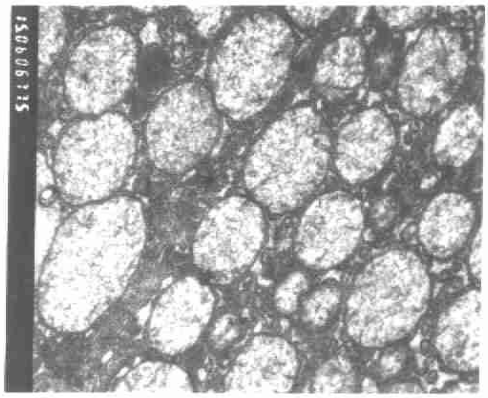


图 1 实验组 1 肿瘤细胞的线粒体明显肿胀(EM 15,000×)

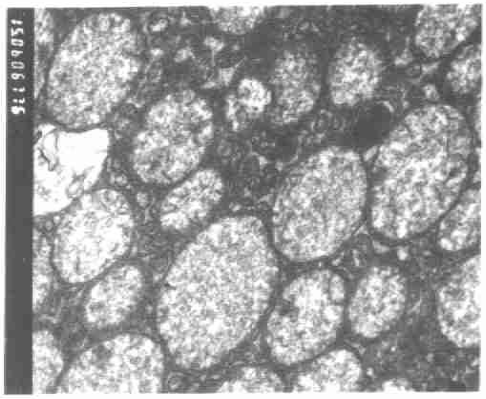


图 2 实验组 2 肿瘤细胞的线粒体(肿胀更明显)(MM 15000×)

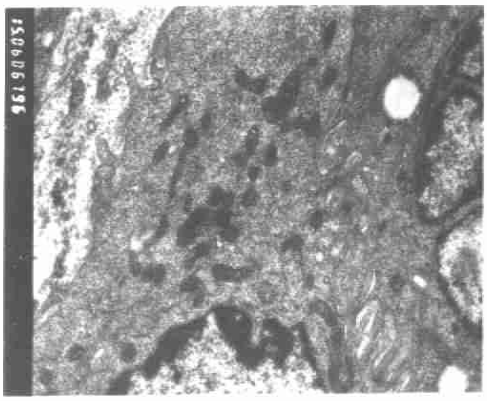


图 3 实验组 3 肿瘤细胞的线粒体缩小、固缩(MM 15000×)

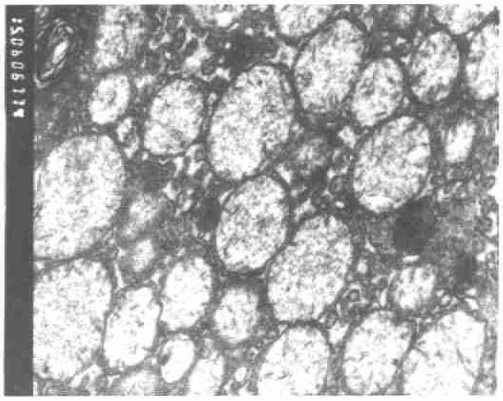


图 4 阴性对照组肿瘤细胞的线粒体(MM 15000×)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 电镜下移植瘤旁肝细胞线粒体的变化

本实验各组肝细胞线粒体肿胀并不明显,其比表面积比较见表 1。经 q 检验实验组肝细胞的线粒体比表面积小于阴性对照组、阳性对照组($P<0.05$),随着 As_2O_3 用药剂量的增加,瘤旁肝细胞线粒体比表面积随之缩小($P<0.05$)。

2.3 肿瘤组织凋亡形态学改变

实验组肿瘤组织中可见肿瘤细胞体积缩小、染色质浓缩,细胞核边集、凋亡小体等典型的凋亡形态学改变。各组伴有凋亡形态学改变的只数是阴性对照组 0 只、阳性对照组 1 只、实验 1 组 4 只、实验 2 组 6 只、实验 3 组 9 只,经趋势检验显示实验组肿瘤细胞产生凋亡的只数明显多于阴性对照组、阳性对照组,随着 As_2O_3 剂量的增加,产生肿瘤细胞凋亡例数增多的趋势显著($P<0.01$)。

表 1 As_2O_3 对肿瘤细胞线粒体比表面积的影响($\bar{x}\pm s$)

实验分组	肿瘤细胞	肝细胞
阴性对照组	9.56±0.24	9.72±0.37
阳性对照组	9.28±0.24	9.31±0.14
实验组 1	7.37±0.34	9.06±0.81
实验组 2	4.21±0.21	8.61±0.35
实验组 3	20.39±3.52*	8.15±1.33

注:该组线粒体主要呈固缩改变,线粒体体积缩小,其比表面积反明显增大。

3 讨 论

3.1 选择性损伤肝脏肿瘤细胞的线粒体

线粒体的改变能诱导细胞凋亡和坏死[5]。MTP 下降是凋亡发生的重要环节,线粒体在损伤的早期表现为适应性增生,MTP 升高;中期呈退化改变,MTP 降低;晚期线粒体肿大、外膜崩溃,MTP 亦降至最低[3,6],线粒体受损后形态学上表现为线粒体肿大、变小、线粒体内出现包涵物、坏死,线粒体不可复性损伤进一步发展,线粒体则走向死亡,其过程或为其膜结构的溶解或为线粒体不断固缩、变小、变致密,最后崩解为碎片[7]。MTP 降低,线粒体膜通透性增加,位于线粒体内外膜间的一系列凋亡因子被释放,随后引起级链式的凋亡反应。故测定线粒体的变化也可用于检测 As_2O_3 诱导凋亡的作用。通过本实验各组发生线粒体改变的只数比较证实,实验组肿瘤细胞线粒体改变的只数显著高于阴性对照组、阳性对照组($P<0.01$)。随着 As_2O_3 剂量的增加,实验组内线粒体损伤的只数增加($P<0.01$)。测量线粒体比表面积的意义在于:线粒体的比表面积越小,其结构肿胀程度越重;反之,比表面积越大,则线粒体结构肿胀程度越轻[4]。经线粒体比表面积定量分析显示实验组 1、2 肿瘤细胞的线粒体比表面积明显小于阴性对照组、阳性对照组($P<0.05$),实验组 3 肿瘤细胞线粒体多呈固缩改变,线粒体体积缩小,其比表面积反增大,且远大于对照组($P<0.05$)。然而,实验组肿瘤细胞线粒体改变明显,而同一实验组瘤旁肝细胞线粒体肿胀不明显,同一实验组内肿瘤细胞线粒体比表面积与瘤旁肝细胞线粒体比表面积比较差异具有显著性($P<0.05$)。表明经肝动脉灌注 As_2O_3 对肿瘤细胞损伤的程度明显重于瘤旁肝细胞,提示经肝动脉灌注 As_2O_3 能选择性地损伤肿瘤细胞线粒体,干扰其能量代谢。

3.2 不同浓度 As_2O_3 对肿瘤细胞线粒体的影响

本实验显示实验组间肿瘤细胞线粒体改变程度不同($P<0.01$),差异具有显著性。实验组 1、2 瘤细胞的线粒体主要表现为肿胀,线粒体比表面积缩小,实验组 2 比实验组 1 的线粒体肿胀更加明显;实验组 3 肿瘤细胞的线粒体主要表现为明显缩小、嵴内间隙肿胀,线粒体固缩,少数表现为线粒体肿胀,线粒体比表面积反而显著增大,由于线粒体固缩为线粒体崩解、坏死前的改变,表明该组经 As_2O_3 治疗后线粒体损伤程度最重,它与该组的抗肝癌作用也是最强相一致。实验组间肿瘤细胞线粒体比表面积比较($P<0.05$),差异具有显著性;同时随着经肝动脉灌注 As_2O_3 的剂量的增加,肿瘤组织凋亡产生增多的趋势明显($P<0.01$),差异存在显著性。证实随着经肝动脉灌 As_2O_3 的剂量的增加,As_2O_3 对肿瘤细胞的线粒体损伤程度加重,诱导凋亡的作用亦增加。

(致谢:感谢重庆医科大学超声生物工程研究所为本次动物实验提供帮助。)

参 考 文 献

[1] Wang TS, Kuo CF, Jan, et al. Arsenic induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species[J]. J Cell Physiol, 1996; 169(2): 256 - 260.

[2] Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control

(下转第 671 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

静脉及门静脉内有大量气泡存在,有时甚至阻断了血流,其中一例还可见一明显的肠系膜静脉栓塞灶。这在证实双氧水经肠壁吸收入血,可产生大量气泡随血流经门静脉入肝进行肝脏声学造影的同时,也说明双氧水在血循环中所产生的微气泡直径较大,可能成为微循环中的"异物"[6]。虽然它们大多数不造成明显的微循环栓塞,但当大量微气泡涌入微循环中,可造成单位体积微循环中红细胞数量减少,引起相对微循环缺血,从而影响血液的流动状态和血管运动性,同时也可能引起栓塞,导致微循环所支配区域的组织发生缺血,甚至坏死。

因此在临床应用中,必须考虑到使用双氧水的有效性与安全性相结合,本研究发现,在双氧水浓度为 1%,用量为 10ml 及 15ml 时均能产生较好的造影效果,同时对肠道的损伤也较小,因此这可以在一定程度上指导双氧水结肠灌注造影在临床的应用。除此之外,目前还有报道可采取造影前地塞米松保留灌肠法,造影后快速温水冲洗法及高锰酸钾中和法等[5,7]手段,来减少双氧水对肠粘膜的刺激和损伤,从而提高双氧水结肠灌注造影在临床的应用的安全性。这些方式均具有一定的效果,但还有待于进一步肯定和完善。

参 考 文 献

[1] 毕素栋,张鲁文. 声学造影检查诊断 Budd - Chiari 综合征[J]. 新消化病学杂志,1996;4(9):499 - 500.

[2] 李丽亚,谭必勇,杨 兵. 应用双氧水行肝动脉造影在肝脏肿瘤中的诊疗价值[J]. 临床放射学杂志,1994;13(2):112 - 115.

[3] 丛洪良,王佩显,黄灿亮,等. 右心声学造影与彩色多普勒在心血管畸型诊断中的价值分析[J]. 实用心脑肺血管病杂志,1999;7(1):3 - 5.

[4] 梁荷英,曹玉英,刘瑞霖,等. 双氧水肝声学造影法诊断肝内占位性病变的临床应用[J]. 中国超声医学杂志,1989;5(4):208 - 210.

[5] 尹玉成,王怀禄,张希平,等. 双氧水肝声学造影诊断肝血管瘤价值的探讨[J]. 甘肃医药,1990;9(5):262 - 264.

[6] 杨 兵,李 拓,王开权,等. 声学造影与微循环关系的研究[J]. 中国超声医学杂志,2000;16(5):332 - 334.

[7] Varani - J, Ginsburg - I, Gibbs - D - F, et al. Hydrogen peroxide - induced cell and tissue injury: protective effects of Mn2 + [J]. Inflammation, 1991;15(4):291 - 301.

(上接第 614 页)

of apoptosis[J]. Immunol Today, 1997;18(1):44 - 52.

[3] Shen ZY, Shen J, Cai WJ, et al. The alteration of mitochondria is a early event of arsenic trioxide induced apoptosis in esophageal carcinoma cells[J]. Int J Mol Med, 2000;5(2):155 - 158.

[4] 杭振镶,蔡文琴,主编. 电子显微镜术在临床医学的应用[M]. 重庆:重庆出版社,1990;(1):74 - 101.

[5] Lee HC, Yin PH, Lu, et al. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells[J]. Biochem J, 2000;348:425 - 432.

[6] Shen ZY, Shen J, Li QS, et al. Morphological and functional changes of mitochondria in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenic trioxide[J]. World J Gastroenterol, 2002;8:31 - 35.

[7] 武忠弼,主编. 超微病理论断学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2003;(1):92 - 94.

(上接第 640 页)

中华流行病杂志,1998;19(3):162 - 164.

[3]刘 湘. 国外老年流行病学研究概况[J]. 实用老年医学,1995;9(4):150 - 153.

[4] 周云芳,吴晓光,汤 哲,等. 老年人常见病调查与随访分析[J]. 中华老年医学杂志,1997;16(1):49 - 52.

[5] 高芳坤,于普林,郑 宏,等. 北京城乡几种常见老年流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志,1998;19(3):159 - 161.

[6] 施箴吾,张素君,杨远明,等. 成都市 3333 例老年人健康状况调查分析[J]. 中华流行病谤杂志,1998;19(1):15 - 17.

[7] 董美阶,程德明,董学平. 宜昌市 1978 ~ 1999 年居民死因流行病学特征及减寿分析[J]. 中国预防医学杂志,2003;4(2):107 - 109.

[8] 王树声,严 镭,石元俊. 1990 ~ 1992 年广西老年人口主要死因及死亡率分析[J]. 广西预防医学,2002;8(6):328 - 333.

[9] 刘达伟,唐晓君,许 红. 重庆市 1991 - 1998 年老年人癌谱分析[J]. 中华老年医学杂志,2001;20(4):294 - 296.

[10] 程志华. 宁波市城区老年人 1987 ~ 2001 年病伤死亡原因分析[J]. 中国公共卫生 2002;18(10):1160 - 1162.