维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0104-04

稀硫酸溶液兔肝内注射的实验研究

欧阳祖彬[1],黄永火[1],文 明[1],朱明霞[1],陈 鑫[2]

(重庆医科大学临床学院 1.放射科,2.外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:评估活体兔肝内 10%稀硫酸溶液注射的可行性,以期为临床肝癌介入治疗提供实验依据。材料和方法:10 只健康大白兔随机分为两组,在肝内注射 10%硫酸 1ml。第一组:分别于术前、术后即刻、术后 3d、7d 和 15d 行肝肾功能检查。第二组:分别于术后即刻、3d、7d、15d 和 30d 观察病灶病理变化。结果:第一组:兔肝内注射 10%硫酸 1ml 后血清 ALT、AST 有一过性升高,以后逐渐恢复至术前水平。而 ALB、ALP、γ-GGT、TBIL、DBIL 和 BUN 于手术前后比较无明显差异。第二组:组织病理学观察表现为肝细胞变性、凝固性坏死、炎症细胞浸润及肉芽组织增生。结论:稀硫酸对细胞灭活能力强,无明显毒副作用,可成为肝癌局部消融治疗的一种新型肿瘤细胞灭活物质。

【关键词】硫酸;乙醇;治疗,介入性;病理生理学;动物,实验

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-07-13

Experimental study on dilute sulfuric acid injection into rabbit liver

OUYANG Zubin, et al

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

【Abstract】*Objective*: To assess the feasibility of dilute sulfuric acid injected into the rabbit liver in vivo, and to provide experimental proof for the interventional therapy on hepatocellular carcinoma. *Methods*: 10 big white rabbits were randomly divided into two groups. 10% sulfuric acid was injected into liver at a dose of 1ml. In the first group, the biochemical changes in serum were examined before and immediately, 3, 7, and 15 days after the procedure. In the second group, histopathological findings of the liver were observed after 10% sulfuric acid injected into liver immediately, 3, 7, 15 and 30days postoperatively. *Results*: The ALT and AST level in serum had transient elevation, but shortly returned to the same level as before the procedure. There was no significant elevation of ALB, ALP, γ-GGT, TBIL, DBIL and BUN level after the procedure. Pathological changes indicated hepatocellular degeneration, coagulative necrosis, inflammatory cells infiltration and granulation tissue proliferation. *Conclusion*: Diluted sulfuric acid have strong power of cells inactivation, but without obvious toxicity and side-effect, which could be a new type of tumor cells inactivation material for the treatment of hepatocellular carcinoma local ablation.

【Key words】Sulfuric acid; Ethanol; Therapy, interventional; Physiopathology; Animal, laboratory

肝癌局部消融治疗主要包括经皮化学物质注射疗法(如无水乙醇、50%乙酸、氢氧化钠溶液、高热生理盐水、高热化疗药物等),经皮局部高热治疗(如射频消融术、微波凝固疗法、激光凝固疗法)及冷冻治疗等。如何提高肿瘤坏死范围,降低毒副作用是肿瘤局部消融治疗的关键。笔者分析经皮瘤内注射各种药物治疗的优缺点,发现硫酸具有很强的蛋白变性及脱水作用。本实验初步观察兔肝内 10%硫酸注射后血清生化及肝脏病理改变,评价该方法治疗的可行性,以期为临床肝癌介入治疗提供实验依据。

作者介绍:欧阳祖彬(1973-),男,住院医师,硕士,主要研究方向:肝癌介入治疗。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康纯种新西兰大白兔 10 只,雌雄不限,体重 2.5~3kg,由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.2 试剂

10%硫酸,无水乙醇,速眠新注射液,苏醒灵注射液(长春农牧大学兽医研究所生产)。

1.3 仪器设备

H600 HITA CHI 透射电子显微镜。

1.4 方法

10 只大白兔随机分为两组。兔子上腹部用 8% Na_2S 脱

维普资讯 http://www.cqvip.com

毛，速眠新 0.2ml/kg 肌肉注射麻醉后，四肢固定，常规消毒铺巾，沿剑突下正中腹切开，于肝左外叶缓慢注入 10% 稀硫酸 1ml，并在注射过程中缓慢旋转注射针以改变注射方向，注射完毕后缓慢拔针，用纱布轻压穿刺点，无出血后，逐层关腹，入笼饲养。

第一组　分别于术前、术后即刻，3d、7d、15d 取兔耳缘静脉血作肝肾功能检查，检查项目包括：白蛋白(ALB)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、γ－谷氨酰转肽酶(γ－GGT)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、血尿素氮(BUN)。

第二组　组织病理学检查：

1)5 只兔分别于术后即刻、3d、7d、15d、30d 处死，取样包括坏死及周边正常肝组织，10% 甲醛溶液固定，石蜡包埋，常规切片，HE 染色，光镜观察。

2)分别将术后即刻、15d 兔肝脏坏死及周边组织，切成 1mm×1mm×1mm 大小，立即置于 4% 戊二醛中，于 4℃ 冰箱中固定 2h，用 0.1M PBS 液反复冲洗，以 1% 锇酸后固定 2h，乙酸和丙酮梯度脱水，618 还氧树脂浸透包埋、定位，超薄切片，醋酸双氧铀和硝酸铅染色，H－600 透射电镜观察、摄片。

2　结　果

2.1　10% 硫酸在兔肝内注射对肝肾功能的影响(见表 1)。

2.2　组织病理学改变

兔肝内注射 10% 硫酸 2h 后，病灶切面大致呈椭圆形，灰白色，与周围正常肝组织分界清楚(图 1)。光镜下观察(图 2)主要表现为：注射后即刻，肝窦扩张充血，肝细胞索解体，细胞体积缩小，间隙增大，胞浆红染，核浓缩，但细胞轮廓尚完整；2h 后，肝细胞索解体更明显，肝细胞脂肪变性；3 天后病灶中央大片凝固性坏死，细胞排列紊乱，胞浆疏松，核溶解消失。周边肝细胞缩小，核深染。外周边缘带内中性粒细胞、淋巴细胞浸润；7 至 15 天后，成纤维细胞增生，胶原纤维增多，胆管上皮细胞再生，淋巴细



图 1　兔肝内注射 10% 硫酸 1ml2 小时后的大体形态：病灶为白色凝固性坏死，边界清楚。

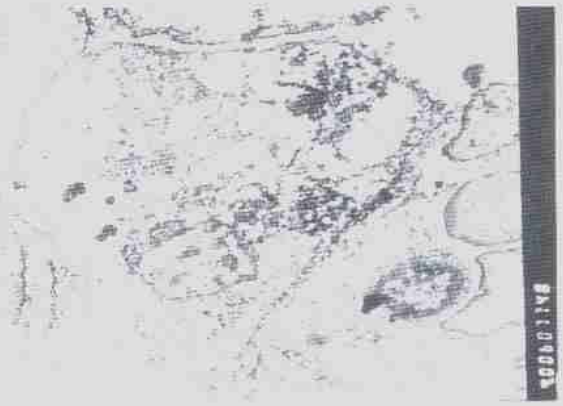


图 3　稀硫酸兔肝内注射后即刻，电镜观察：毛细胆管紧密连接破坏。(×4,000)



图 4　稀硫酸兔肝内注射术后 15 天，电镜观察：肝细胞电子密度降低，质膜、核膜破裂，细胞器模糊。(×3,500)

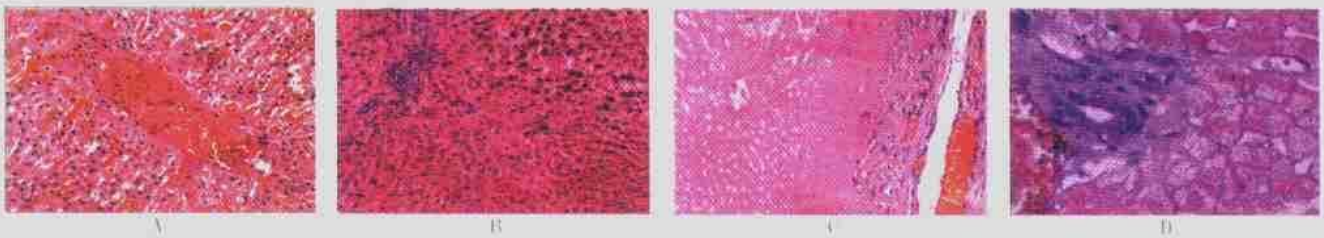


图 2　稀硫酸兔肝内注射后，光镜下表现：术后即刻，A：肝窦充血扩张　B：肝组织结构破坏，肝细胞分离，核固缩，细胞间隙增大。术后 3 天，C，D：肝细胞大片凝固性坏死，肝细胞溶解，核消失。边缘带内炎症细胞浸润。(A，B，C　HE×100　D　HE×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 10%硫酸兔肝内注射前后血清生化改变($\bar{x} \pm s$,单位 IU/L)

时间	标本数	检查项目				
		ALB	ALT	AST	ALP	BUN
注射前	5	37.0±5.4	55.0±12.9	64.0±14.0	66.4±9.4	6.7±0.9
注射后即刻	5	38.8±6.9	258.2±145.5*	149.2±46.6*	73.0±22.4	7.0±1.0
注射后 3 天	5	32.2±1.3	230.6±87.8*	56.0±41.6	65.2±18.6	5.9±1.4
7 天	5	33.4±2.6	67.6±17.1	31.0±12.2	48.6±15.7	5.1±0.9
15 天	5	32.4±2.9	56.2±14.9	30.4±6.4	43.8±11.3	7.3±3.5

注*:$P<0.05$

胞、多核巨细胞浸润。

电镜观察(图 3,4):2h 后,肝细胞间隙增大,毛细胆管紧密连接破坏。细胞轮廓尚清,胞浆电子密度降低,细胞器聚集,质膜、核膜完整。染色质边集,小胆管内皮细胞变性,细胞器肿胀:15 天后细胞呈溶解状态,质膜、核膜破裂,细胞器轮廓不清。

3 讨 论

经皮穿刺乙醇注射(Percutaneous Ethanol Injection,PEI)因具有操作简便,安全有效,创伤小等特点而广泛应用于临床。但在实际应用中也存在以下问题:乙醇的肝脏代谢产物醛类物质会造成肝脏损害。此外,单次大剂量 PEI(single session PEI)治疗随着注射剂量的增加副作用发生率也增大,且易出现严重并发症,如肝功能衰竭、食道静脉曲张破裂大出血等[1,2]。因此,注射剂量和并发症制约着肝癌介入治疗效果,寻找一种不增加注射剂量即可导致肿瘤完全坏死,且局部和全身毒副作用小的物质,对临床肝癌治疗有很大的价值。

硫酸具有蛋白变性和脱水作用[3]。注入肝组织内的硫酸在病灶周围形成浓度差,病灶中央细胞因迅速脱水及蛋白变性作用而发生凝固性坏死,病灶外周随着 H^+ 浓度降低,细胞膜通透性增加、内外环境改变而主要使细胞变性。实验中还发现,硫酸注射过程中还会对细胞造成一过性热效应。

由于硫酸腐蚀性强,因此笔者首先在离体猪肝上探索适宜于肝内注射的硫酸浓度,发现在小剂量(<2ml)注射时,10%硫酸适宜于兔肝内注射,且较无水乙醇有较强的细胞灭活能力。

兔肝内 10%硫酸注射术后,血清 ALT、AST 有一过性增高,3 至 15 天后逐渐恢复正常,其它血清生化指标如 ALB、ALP、BUN、TBIL 则无明显影响,表明 10%硫酸对肝脏具有一过性损害。由于机体内存在强大的缓冲系统和一系列调节机制以维持机体内外环境平衡,即使 H^+ 进入血液系统也不会造成酸碱平衡紊乱,而 SO_4^{2-} 离子则通过肾脏排泄,从而对肝脏及其它重要组织器官不会造成损害,对术后肾脏组织病理学检查亦未见肾小球和肾小管明显的病理改变。本实验虽未对术后血清 PH 值是否有变化作统计学分析,但考虑到机体自我调节机制以及从兔术后生存状况来看,可以认为稀硫酸肝内注射对兔血清 pH 值无明显影响。

离体猪肝稀硫酸和无水乙醇注射实验结果表明:稀硫酸可造成肝组织更强的凝固性坏死。另外在预实验中,活体兔肝内各注射 1ml 无水乙醇和 10%稀硫酸,乙醇组 5 只兔中有 2 只术后不久即死亡,而硫酸组无一例死亡。解剖标本时发现,乙醇组内意外死亡兔肝坏死面积偏小,故兔死亡原因可能是无水乙醇进入血液对心血管中枢的抑制作用而造成的意外死亡。无水乙醇及其醛类代谢产物会加重肝脏损害,而稀硫酸中 H^+ 和 SO_4^{2-} 则可直接参与物质代谢,不会造成肝脏和其它脏器的二次损害。本实验尚未进一步观察硫酸的毒性作用:即兔肝内单次注射或多次注射时致兔死亡的最大剂量和安全剂量,或单次注射剂量或多次注射总量与肝体积之比,以探索出适用于临床应用的安全剂量,这对肝癌特别是大肝癌病灶的治疗有很大的指导作用。一般认为,PEI 治疗的剂量并非绝对,而视随访过程中肿瘤坏死程度和病人耐受力而定,且单次大剂量 PEI 治疗时可静脉滴注 1.6 二磷酸果糖和谷胱甘肽以增加乙醇的代谢,降低其毒副作用[1,2,4,5]。由此可以推测,在硫酸较大剂量注射时,也可静脉滴注碳酸氢盐以预防 H^+ 入血可能造成的酸碱平衡紊乱。而经皮穿刺硫酸注射(Percutaneous Sulfuricacid Injection PSI)术后副作用及并发症,如腹痛、发热、化学性腹膜炎等可能出现的并发症是否较 PEI 治疗时轻,这些都有待进一步观察。在临床实际运用中,如何掌握硫酸注射剂量、减轻返流、降低其副作用、降低对肝肾功能的影响以及术后疗效都需进一步研究。借

维普资讯 http://www.cqvip.com

鉴 PEI 治疗的成熟经验，采用旁侧孔穿刺针，B 超实时监视定向穿刺注射以及利用最新的影像学检查手段，发现残存肿瘤组织，对提高肝癌 PSI 疗效也有很大的帮助[6~9]。

因此，稀硫酸对细胞灭活能力强，毒副作用小，有望成为肝癌局部消融治疗的一种新型肿瘤细胞灭活物质。

参 考 文 献

[1] Livraghi T. Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2001;48(1):20 - 24.

[2] Livraghi T, Benedini V, Lazzaroni S, et al. Long term results of single session percutaneous ethanol injection in patents with large hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 1998;83(1):48 - 57.

[3] 安家驹，译. 公害与毒物[M]. 北京：化学工业出版社，1981;311.

[4] Meloni F, Lazzaroni S, Livraghi T. Percutaneous ethanol injection: single session treatment[J]. Eur J Ultrasound, 2001;13(2):107 - 115.

[5] Livraghi T, Giorgio A, Marin G, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long - term results of percutaneous ethanol injection[J]. Radiology, 1995;197(1):101 - 108.

[6] Choi D, Lim HK, Kim SH, et al. Hepatocellular carcinoma treated with percutaneous radio - frequency ablation: usefulness of power Doppler US with a microbubble contrast agent in evaluation therapeutic response - - preliminary results[J]. Radiology, 2000;217:558 - 563.

[7] Kazumits K, Tsutomu N, Takeshi I, et al. Power Doppler sonography: Evaluation of hepatocellular carcinoma after treatment with transarterial embolization or percutaneous ethanol injection therapy[J]. AJR, 2000;174:337 - 341.

[8] Vogl TJ, Mack MG, Roggan A, et al. Internally cooled power laser for MR - guided interstitial laser - induced thermotherapy of liver lesions: initial clinical results[J]. Radiology, 1998;209:381 - 385.

[9] Chen RC, Chen WT, Liao LY, et al. Intravenous contrast - enhanced Doppler sonography and intra - arterial carbon dioxide - enhanced sonography in the assessment of hepatocellular carcinoma vascularity before and after treatment[J]. Acta Radiol, 2002;43(4):411 - 414.

(上接第 103 页)熟；参与胚胎发育的调控，子宫内膜 LIF 表达缺陷时胚胎不能着床。

人 LIF 基因定位于第 11 号染色体，由 3 个外显子和 2 个内含子组成，基因编码区高度保守。成熟的 LIF 蛋白高度糖基化，分子内部二硫键对于维持 LIF 分子的结构和生物学活性可能起重要作用。在原核系统中表达真核蛋白存在许多困难，影响蛋白质二硫键形成、糖基化等，降低活性，而利用真核表达系统将确保蛋白质修饰，为了获得具有生物活性的 LIF 蛋白，构建其哺乳动物细胞表达系统是十分必要的。真核表达质粒 PCDNA3.1(+)含有高效增强子 SV40，这是一类能促进基因转录活性的顺式调控元件，并且在多克隆位点前有基因启动结构 T7PcMV，具有 Amp 和 Neo 基因，可在原核和真核系统中进行筛选，建立稳定表达目的基因的哺乳动物细胞系。因此把 LIF 基因插入 PCDNA3.1(+)得到的重组质粒将利于转染和表达。

本实验通过 RT - PCR 的方法克隆 LIF 基因，包含起始密码子和终止密码子，含有信号肽编码区，构建含 LIF 基因的真核表达载体，将有利于研究其多方面的生物学作用。为进一步探讨人 LIF 基因在哺乳动物细胞中的高效表达、获得重组人 LIF 蛋白及含 LIF 因子的条件培养基奠定基础。

参 考 文 献

[1] Viswanathan S, Benatar T, Rose - John S, et al. Ligand/Receptor Signaling Threshold(LIST) Model Accounts for gpl30 - Mediated Embryonic Stem Cell Self - Renewal Responses to LIF and HIL - 6[J]. Stem Cells, Mar 2002;20:119 - 138.

[2] Thomson JA, Joseph Itskovitz - Eldor, Sander S, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts [J]. Science, Nov 1998;282:1145 - 1147.

[3] Wright, LS, Li J, Cald well MA, et al. Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor [J]. Neurochem, 2003;86(1):179 - 195.

[4] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides[J]. Nature, Dec 1988;336(6200):688 - 690.

[5] Kurzrock R, Estrov Z, Wetzler M, et al. LIF: not just a leukemia inhibitory factor[J]. Endocr. Rev., Aug 1991;12:208 - 217.