DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.008
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
1436 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)16-1436-03

经兔肝动脉灌注 As_2O_3 对肝移植瘤作用的实验研究

郑明友,吴诚义 (重庆医科大学第一附属医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨经兔肝动脉灌注 As_2O_3 对肝移植瘤的抑制作用。方法 采用不同浓度 As_2O_3 经肝动脉插管灌注治疗兔肝脏 Vx-2 移植瘤,连续 7 d,观察肿瘤平均质量、平均瘤重抑制率、肿瘤细胞形态学变化,检测 bcl-2/bax 基因表达和 VEGF 表达。结果 实验组的平均瘤重分别为 7.99、6.50、4.87 g,平均瘤重抑制率分别为 50.31%、59.58%和 69.71%,实验组移植瘤瘤重低于阴性对照组($P<0.05$)。随着 As_2O_3 的剂量增加,实验组的瘤重减轻而平均瘤重抑制率增加($P<0.05$)。实验组内移植瘤组织 bax 基因表达显著上调,bcl-2 基因表达、VEGF 表达显著下调($P<0.05$)。而 bcl-2 基因、VEGF 表达下调无差异性($P=1.00$)。电镜观察实验组各组均有典型的瘤细胞凋亡形态学改变。结论 经肝动脉灌注 As_2O_3 治疗兔 Vx-2 肝移植瘤,有显著的抗肿瘤作用,并具有剂量依赖特点。其诱导瘤细胞凋亡可能主要通过上调 bax 基因表达起作用。

关键词:三氧化二砷;动脉灌注;肝脏;移植;肿瘤
中图法分类号:R452;R735.7;R979.1 文献标识码:A

Experimental study of arsenic trioxide on rabbits with hepatic Vx-2 carcinoma by transcatheter arterial infusion

ZHENG Ming-you, WU Cheng-yi (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the anticancer effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on rabbits with hepatic Vx-2 carcinoma by transcatheter arterial infusion (TAI). **Methods** Rabbits with hepatic Vx-2 carcinoma were treated with As_2O_3 by TAI for 7 d consecutively. The tumor inhibitory rate and the average tumor weight were determined. The morphological changes of the tumor were observed with a transmission electron microscope. bax/bcl-2 and VEGF expressions were examined by immunohistochemistry. **Results** The average weight of the tumor was 7.99, 6.50, and 4.87 g, and the tumor growth inhibitory rates in the experimental groups were 50.31%, 59.58%, and 69.71%, respectively. Tumor growth was significantly inhibited as compared with that in the NS group ($P<0.05$). The upregulated bax expression and downregulated bcl-2 expression were detected in As_2O_3 groups by immunohistochemistry. There was significant difference between the As_2O_3 groups and the control group ($P<0.05$). Significantly decreased VEGF expression was also observed in As_2O_3 groups as compared with the controls ($P<0.05$). Bcl-2 gene expression was consistent with VEGF expression. Transmission electron microscopy showed typical morphological characteristics of apoptosis of some tumor cells in the experimental groups. **Conclusion** As_2O_3 by TAI can inhibit rabbit hepatic Vx-2 carcinoma effectively in a dose-dependent manner. Apoptosis induced by As_2O_3 may be closely related to the upregulated bax expression.

Key words: arsenic trioxide; transcatheter arterial infusion; liver; Vx-2 carcinoma; rabbit

公认经肝动脉介入治疗是肝癌非手术治疗的最佳途径,但目前所用药物及栓塞剂效果尚不满意。本实验拟经肝动脉灌注(transcatheter arterial infusion, TAI)不同浓度 As_2O_3 治疗兔肝脏 Vx-2 移植瘤,以探索 As_2O_3 在肝癌介入治疗中的有效性。

1 材料和方法

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),雌雄不均,3~4 月龄,体质量 2~3 kg。

1.2 实验材料

1%亚砷酸注射液、2%顺铂注射液购自本院药房。皮下

作者简介:郑明友(1966-),男,四川省南部县人,硕士,副主任医师,主要从事肝胆胰外科基础和临床研究,现在重庆市第三人民医院肝胆外科。电话:(023)67761861

收稿日期:2003-08-18;修回日期:2003-12-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Vx-2 移植瘤种兔由重庆医科大学超声生物工程研究所提供。bcl-2、bax 免疫组化染色试剂盒购自博士德公司, VEGF 免疫组化染色试剂盒购自 NeoMarker 公司。DAB 显色试剂盒、粘片剂购自迈新公司。肝动脉插管购自 BD 公司。

1.3　实验方法

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 1～2 mm^3 瘤块, 将肿瘤块植入肝左前叶内。两周后肝脏上形成一直径约 1 cm的浸润性生长的肿瘤。肝脏移植瘤术后的第 2 周末, 在肝动脉根部穿刺置管并固定。数字表法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 1.28 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)、实验组 1($As_2O_3$ 0.6 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)、实验组 2($As_2O_3$ 1.2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)、实验组 3($As_2O_3$ 1.96 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)。每天经肝动脉插管灌注实验用药, 连续治疗 7 d。肝脏移植瘤术后第 5 周末后, 切取邻近(1.5 cm)肿瘤相同部位正常肝组织和全部肝癌组织。称瘤重, 取肿瘤及肝组织光镜、电镜标本各 1 份。

1.4　观察指标

阳性对照组、实验组的肿瘤重量及其平均瘤重抑制率: 平均瘤重抑制率=(1－给药组的平均瘤重/阴性对照组的平均瘤重)×100%。

透射电镜观察: 瘤细胞、肝细胞的细胞体积、核形态及核染色质变化。

检测 bcl-2/bax 基因表达及 VEGF 表达: 染色结果判断标准 bcl-2/bax 基因表达: 以胞浆或/和胞膜着色呈棕黄色的瘤细胞为阳性细胞。阳性细胞数<5%为(－), 5%～15%为(＋), 15%～50%为(＋＋), >50%为(＋＋＋)。VEGF 表达为新生毛细血管内皮细胞及部分肿瘤细胞胞浆和/或胞膜着色呈棕色为阳性细胞。染色明显者为 VEGF 阳性, 染色弱或不染色为 VEGF 阴性。

1.5　统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SAS8.1 统计软件行 q 检验、Fisher's 精确检验。

2　结果

2.1　对肝移植瘤瘤重的抑制作用

各组瘤重及平均瘤重抑制率见表 1。经 q 检验显示实验组与阴性对照组、实验组 1, 3 比较差异均有显著性($P<0.05$)。实验结果显示实验组内随着 As_2O_3 的剂量增加, 移植瘤瘤重明显下降, 而平均瘤重抑制率显著增加($P<0.05$)。

表 1　As_2O_3 对肝移植瘤瘤重的抑制作用 ($n=10$)

Tab 1　Inhibitory effect of As_2O_3 on rabbits with hepatic Vx-2 carcinoma ($n=10$)

Group	Average tumor weight(g)	Average inhibitory rate(%)
Negative control	16.08±2.69	—
Positive control	6.46±1.42 *	59.83
Experimental 1	7.99±1.35 *	50.31
Experimental 2	6.50±1.71 *	59.58
Experimental 3	4.87±0.73 *#	69.71

$F=84.89$, $P=0.00$, *: $P<0.05$, *vs* negative control; #: $P>0.05$, *vs* Experimental 1

2.2　对移植瘤组织超微结构的影响

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。

2.3　对移植瘤组织 bcl-2 基因表达的影响

bcl-2 基因表达比较见表 2, 经 Fisher's 精确检验显示实验组分别与阴性对照组、阳性对照组相比差异具有显著性($P=0.000$)。实验组间两两比较差异无显著性($P=1.00$)。

表 2　As_2O_3 对移植瘤组织 bcl-2/bax 基因表达及 VEGF 表达的影响

Tab 2　Effects of As_2O_3 on bcl-2/bax and VEGF expressions in the implanted tumor tissue

Group	bcl-2				bax				VEGF	
	－	＋	＋＋	＋＋＋	－	＋	＋＋	＋＋＋	－	＋
Negative control	0	1	3	6	8	2	0	0	1	9
Positive control	1	1	3	5	5	4	1	0	4	6
Experimental 1	9	1	0	0	0	2	5	3	10	0
Experimental 2	10	0	0	0	0	1	4	5	10	0
Experimental 3	10	0	0	0	0	1	2	7	10	0

－: Negative; ＋: Fleet brown; ＋＋: Brown; ＋＋＋: Dark brown

2.4　对移植瘤组织 bax 基因表达的影响

bax 基因表达见表 2, 经 Fisher's 精确检验显示实验组与阴性对照组比 $P=0.01$, 与阳性对照组比 $P=0.033$, 实验组间比较差异无显著性($P>0.05$)。

2.5　对移植瘤组织 VEGF 表达的影响

VEGF 表达见表 2, 经 Fisher's 精确检验显示实验组与阴性对照组比 $P=0.00$, 与阳性对照组比 $P=0.011$, 与实验组间两两比较差异无显著性($P=1.00$)。

3　讨论

3.1　As_2O_3 显著地抑制肝移植瘤生长

陈俊强等[1]发现经腹腔注射 As_2O_3 能抑制裸鼠肝癌皮下移植瘤的生长, 延长荷瘤鼠的生命, 不同浓度 As_2O_3 的肿瘤抑制率为 31.32%～46.53%。陈洪等[2]经鼠尾静脉注射 As_2O_3 后, 证实不同剂量 As_2O_3 均抑制昆明小鼠肝癌皮下移植肿瘤的生长, 肿瘤抑制率为 31.63%～42.13%。钱军等[3]单用 As_2O_3 15 mg/d 外周静脉注射治疗人中晚期肝癌 28 例, 有效率仅为 10.7%。这些研究表明随着给药途径、药物浓度、作用对象的不同, As_2O_3 的抗癌作用存在差异性。本实验 As_2O_3 经 TAI 治疗后的瘤重抑制率达 50.31%～69.71%, 实验组各组的平均瘤重均明显高于阴性对照组($P<0.05$), 且呈剂量效应相关性。证实 As_2O_3 经 TAI 治疗能显著地抑制肝移植瘤生长。其瘤重抑制率显著高于已有文献报道的实验动物中的抑制率, 这与 TAI 治疗使肿瘤组织中 As_2O_3 的浓度高以及 As_2O_3 直接作用肿瘤细胞有关。预示 As_2O_3 在肝癌介入治疗中

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

有较广阔的应用前景。

3.2 选择性诱导肝移植瘤细胞凋亡

本研究显示实验组 bcl-2 基因基本不表达，阴性对照组、阳性对照组呈阳性或强阳性表达，实验组与阴性对照组、阳性对照组相比差异具有显著性（$P<0.05$）。实验组内两两相比无差异性（$P=1.00$）。而 bax 基因的表达明显高于阴性对照组和阳性对照组，实验组与阴性对照组、阳性对照组相比差异具有显著性（$P<0.05$），bax 基因的表达在实验中两两比较差异无显著性（$P>0.05$）。表明 As_2O_3 经 TAI 治疗能显著上调 bax 基因的表达，并与 As_2O_3 存在剂量相关性，同时明显下调 bcl-2 基因的表达，却不存在量效关系。实验组 VEGF 多不表达，而阴性对照组、阳性对照组 VEGF 多呈阳性表达，实验组与阴性对照组、阳性对照组比较差异同样具有显著性（$P<0.05$）。鉴于已有实验研究证实 VEGF 能上调凋亡抑制基因 bcl-2 的表达[4]。因此 As_2O_3 作用于移植肿瘤细胞后，降低 VEGF 表达的同时，亦下调 bcl-2 表达。本实验证实不同剂量 As_2O_3 经肝动脉 TAI 治疗均引起肝移植瘤凋亡抑制基因 bcl-2 表达显著下调、凋亡促进基因 bax 表达显著上调。同时 VEGF 表达明显下调，并与 bcl-2 基因表达具有一致性。表明 As_2O_3 经 TAI 治疗引起肿瘤细胞 bax 基因的表达明显比 bcl-2 基因的表达占优势，以及 VEGF 显著的低表达不能上调 bcl-2 基因表达，从而导致 Vx-2 肝癌移植瘤瘤细胞的显著凋亡。推测 As_2O_3 经 TAI 治疗诱导移植瘤细胞凋亡可能主要通过上调凋亡诱导基因 bax 表达起作用。

本实验组电镜观察均显示典型的瘤细胞凋亡形态学改变，而在瘤旁正常肝组织和对照组肿瘤组织中未显示此种现象，进一步证实 As_2O_3 经 TAI 治疗可以选择性诱导肝移植瘤细胞凋亡。其结果与人们通过流式细胞仪、电镜观察证实 As_2O_3 能诱导人肝癌细胞株[5,6]，昆明小鼠肝癌皮下移植瘤[2]瘤细胞凋亡并出现典型的凋亡形态学改变的结果一致。

（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的帮助。）

参考文献：

[1] 陈俊强，李绍森，彭民浩，等. 三氧化二砷对肝癌裸鼠移植瘤模型作用的实验研究[J]. 广西医科大学学报，2001，18(1)：14－16.

[2] 陈 洪，秦叔逵，潘麒声，等. 三氧化二砷抗肝癌作用的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志，2000，8(1)：27－29.

[3] 钱 军，秦叔逵，何泽明，等. 三氧化二砷治疗中晚期原发性肝癌的临床研究[J]. 中华肝脏病杂志，2002，10(1)：63.

[4] Pidgeon G P，Barr M P，Harmey J H，*et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates bcl-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells[J]. Br J Cancer，2000，85(2)：273－278.

[5] Siu K P，Chan J Y，Fung K P. Effect of arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells inhibition of proliferation and induction of apoptosis[J]. Life Sci，2002，71(3)：275－285.

[6] Liu J W，Tang Y，Shen Y，*et al*. Synergistic effect of cell differential agent-Ⅱ and arsenic trioxide on induction of cell cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells[J]. World J Gastroenterol，2003，9(1)：65－68.

（编辑 张大春）

（上接1435页）

3 讨论

头胸导联是一种新型的双极导联，它是将参比电极与接地极并置于右前额，相距2～5 mm，探查电极根据要求随意放置胸、背、腰、腹各点记录心电图；与Wilson导联相比，参比点的电位与相位更接近理想零位，单极性更强而获得的心电图更满意。根据尹炳生提出的头胸导联的拟球状面心电位场假说的原理[1]，右胸头胸导联心电图各波的分布状态及其演变规律与左胸图形一致且略大，具有全方位的定位能力。不仅能表达Wilson导联所发现的心电变化，对常规Wilson导联难以表达的“右室死角”，如右室梗塞、膈面及侧壁的病变等均有明确的表达能力。由于Wilson导联的局限性，在Wilson导联二级心电图形的波型均较小，不利于对P波的辨认（如V1～V6等）。而头胸导联心电图的P波比导联心电图大20%～30%，在右胸两者相差更为明显。本研究通过对43例阵发性房颤患者头胸导联与Wilson导联P波振幅与时间的对比分析显示：头胸导联P波无论在振幅、时间均明显大于Wilson导联（$P<0.05$）。

头胸导联是用1个参比点取代常规心电图所包含的6个参比点，符合实验学科的实验测试原则，因而具有理论及临床应用的优势[1]。头胸导联心电图拟球状面心电位场假说的原理在于探查电极有24个部位的头胸导联心电图均为具有一级诊断能力的头胸导联23个，也有利于对P波的辨认。而常规Wilson导联心电图P波较小，给某些心律失常心电图诊断带来困难。因此，我们认为，对某些难以正确判断的心律失常时，用头胸导联心电图较Wilson导联心电图为优。

关键词：头胸导联；Wilson导联；心电图；心房颤动

中图法分类号：R540.41 文献标识码：B

参考文献：

[1] 朱 浩，周 翔. 头胸导联心电理论专家论证会纪要[J]. 中华心律失常学杂志，1999，3(4)：320.

（编辑 张 宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net