

Oxidative stress and apoptosis of VX2 hepatocarcinoma after transcatheter arterial embolization in rabbit

WU Chunhua, DU Wei*, YU Yijun, WANG Beiran

(Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the oxidative stress and apoptosis of paracancerous liver tissue after transcatheter arterial embolization (TAE) in rabbit models with VX2 hepatocarcinoma, in order to investigate the role of oxidative stress and apoptosis in liver tissue injury. **Methods** Twenty-five rabbit VX2 hepatocarcinoma models were established and randomly divided into TAE group ($n=13$) and control group ($n=12$). TAE group was treated with TAE, while no treatment was performed on control group. Peripheral blood indexes, including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBI), serum albumin (ALB) and prothrombin time (PT) were detected three days after operation in TAE group and the same time in control group. Then the experimental animals were killed, and the samples of tumor tissues and paracancerous liver tissues were obtained for histopathological examination, bioenzyme detection and apoptosis detection. The levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), Catalase (CAT) were detected by biochemical enzymatic assay. The apoptosis of hepatocytes was detected by using TUNEL method, and the apoptotic index (AI) was calculated. **Results** Compared with control group, ALT, AST and TBI increased, ALB decreased and PT prolonged, while SOD, GSH-PX, CAT decreased in TAE group (all $P<0.001$). Mild steatosis and inflammatory cell infiltration were observed in paracancerous liver tissue of TAE group, while only mild steatosis was observed in control group. AI of TAE group was significantly higher than that of control group ($[64.20 \pm 2.77]\%$ vs $[2.20 \pm 1.90]\%$; $t=-112.30$, $P<0.001$). **Conclusion** The decrease of liver function after TAE in rabbit VX2 hepatocarcinoma models maybe associate with the decrease of antioxidant activity and the oxidative stress which eventually lead to the increase of hepatocyte apoptosis.

[Keywords] liver neoplasms; transcatheter arterial embolization; oxidative stress; apoptosis; models, animal; rabbits

DOI:10.13929/j.1672-8475.201804022

兔 VX2 肝癌经导管动脉栓塞术后癌旁肝组织氧化应激及细胞凋亡

吴春华, 杜伟*, 余义俊, 王贝然

(大理大学第一附属医院放射科, 云南 大理 671000)

[摘要] **目的** 观察兔经导管动脉栓塞(TAE)治疗后 VX2 肝癌模型癌旁肝组织中氧化应激及细胞凋亡情况, 探讨其在肝组织损伤中的作用。 **方法** 建立 25 只兔 VX2 肝癌模型, 随机分为 TAE 组(13 只)及对照组(12 只), 对 TAE 组行 TAE 治疗, 对照组不做任何处理。于 TAE 组术后 3 天及对照组同期检测外周血丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBI)、血清白蛋白(ALB)、凝血酶原时间(PT)。而后处死实验动物, 获取肿瘤组织及癌旁肝

[基金项目] 国家自然科学基金(81660300)。

[第一作者] 吴春华(1987—), 男, 云南楚雄人, 在读硕士, 主治医师。研究方向: 影像诊断与介入放射学。E-mail: chunhuawvip@163.com

[通信作者] 杜伟, 大理大学第一附属医院放射科, 671000。E-mail: 2393350136@qq.com

[收稿日期] 2018-04-15 **[修回日期]** 2018-10-25

组织离体标本,用于组织病理检查、生物酶学检测及细胞凋亡检测。以生化酶学方法检测超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)及过氧化氢酶(CAT);采用 TUNEL 法检测肝细胞凋亡情况,计算细胞凋亡指数(AI)。**结果**与对照组比较,TAE 组 ALT、AST、TBI 升高,ALB 降低,PT 延长;SOD、GSH-PX、CAT 均减低(P 均 <0.001)。TAE 组癌旁肝组织可见轻度脂肪变性及大量炎性细胞浸润,对照组癌旁肝组织仅见轻度脂肪变性。TAE 组 AI 为(64.20 \pm 2.77)%,明显高于对照组[(2.20 \pm 1.90)%; $t=-112.30, P<0.001$]。**结论** 兔 VX2 肝癌模型 TAE 术后肝功能下降可能与癌旁肝组织抗氧化指标活性明显降低,发生氧化应激,导致肝细胞凋亡增多有关。

[关键词] 肝肿瘤;经导管肝动脉栓塞;氧化性应激;细胞凋亡;模型;动物;兔

[中图分类号] R815; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2019)02-0112-05

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是常见恶性肿瘤之一。我国肝癌发病率逐年上升^[1],且多数患者在确诊时已经失去手术切除或肝移植治疗机会^[2]。近年来,经导管动脉栓塞(transcatheter arterial embolization, TAE)已逐渐成为治疗 PHC 的首选方法^[3-4],其肿瘤局部控制率较高,但术后患者出现不同程度肝功能下降,影响生存质量^[5]。本研究建立兔 VX2 肝癌模型,观察 TAE 术后癌旁肝组织氧化应激及凋亡情况,旨在分析 TAE 术后氧化应激及细胞凋亡在癌旁肝组织损伤中的作用,为临床研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 兔 VX2 肝癌模型建立 选取健康新西兰大白兔 37 只(由大理大学动物中心提供),雌雄不限,体质量 2.50~3.50 kg,平均(2.85 \pm 0.25)kg;荷瘤兔 2 只(由东南大学附属中大医院惠赠)。采用改良 CT 定位下瘤块注射法^[6],对 37 只新西兰大白兔建立 VX2 肝癌模型,2 周后经 CT 和/或 MR 检查证实 25 只建模成功(图 1)。

1.2 实验模型分组及处理 将兔 VX2 肝癌模型随机分为 TAE 组($n=13$)及对照组($n=12$)。采用 GE Innova-3100IQ DSA 引导,对 TAE 组行肝动脉罂粟乙碘油注射液及明胶海绵颗粒栓塞。采用 3%戊巴比妥钠麻醉实验兔后,将其保定于自制实验操作台上,对右侧腹股沟附近 10 cm 范围内备皮、消毒后做一切口,以 18G 穿刺针穿刺右股动脉后引入 4F 导管鞘及导管,通过导丝选择至腹腔干,以同轴技术将 TERUMO 微导管(泰尔茂公司)超选择至肝总动脉,造影明确肿瘤供血动脉后,经微导管注射罂粟乙碘油(图 2A),常规剂量(ml)=肿瘤直径(cm) \times 0.2,依据个体肿瘤供血情况适当增减^[7];之后以明胶海绵颗粒进行栓塞,直至供血动脉血流缓慢停止(图 2B)。术毕拔管并结扎肝动脉近端,处理切口。常规饲养对照组实验兔,对其不进行任何处理。

1.3 实验室检查 分组处理后 3 天,对 2 组实验兔均

经耳缘静脉抽血并行实验室检查,以评价其肝功能,包括:丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin time, TBI)、血清白蛋白(serum albumin, ALB)及凝血酶原时间(prothrombin time, PT)。

1.4 离体标本处理 完成实验室检查后处死实验兔,并于其左上腹剑突下行腹正中切口,完整取出肝脏,分离肿瘤组织与癌旁肝组织(距肿瘤 >2 cm)^[8],作为实验标本。

1.5 组织病理检查 对 2 组肿瘤组织及癌旁肝组织标本均进行固定及石蜡包埋、切片(厚度 3~4 μ m)及 HE 染色,采用 Olympus BX41 光学显微镜行组织病理学检查。

1.6 生物酶学检测 分别采用超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司),对 2 组癌旁肝组织标本进行检测。

1.7 细胞凋亡检测 采用细胞凋亡检测试剂盒(购于北京中杉金桥生物技术有限公司),对 2 组癌旁肝组织标本进行检测,以 TUNEL 法评估细胞凋亡情况。细胞核内着色呈褐色(包括深、浅褐色)或棕黄色即为凋亡细胞。凋亡指数(apoptosis index, AI)计算:在高倍光学显微镜($\times 400$)下随机记数 10 个视野,分别计算该视野内凋亡细胞所占百分比,取平均值作为 AI。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用两独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝功能指标变化 与对照组比较,TAE 组 ALT、AST、TBI 升高,ALB 降低,PT 延长,差异均有统计学意义(P 均 <0.001),见表 1。

2.2 病理改变 组织病理学检查显示,2 组兔 VX2 肝癌模型肿瘤组织细胞均呈条索状、巢状或呈腺管样

表 1 TAE 术后各组肝功能指标测定值($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBI(μ mol/L)	ALB(g/L)	PT(s)
TAE 组(n=13)	83.89 \pm 16.33	117.37 \pm 18.76	20.60 \pm 1.83	33.53 \pm 1.35	15.68 \pm 0.96
对照组(n=12)	53.07 \pm 7.63	76.37 \pm 13.29	14.75 \pm 1.60	36.45 \pm 1.10	13.51 \pm 0.73
t 值	-6.118	-6.530	-7.930	5.936	-6.318
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

排列,核大,癌巢周围可见血管内皮细胞包绕;TAE 组癌旁肝组织轻度脂肪变性,同时可见大量炎性细胞浸润,以单核细胞、中性粒细胞为主(图 3A);对照组癌旁肝组织仅见轻度脂肪变性(图 3B)。

2.3 癌旁肝组织生物酶活性 生物酶学检测显示,TAE 组 SOD、GSH-PX、CAT 均低于对照组(P 均 < 0.001),见表 2。

2.4 癌旁肝组织中细胞凋亡情况 TUNEL 染色结

果显示,TAE 组癌旁肝组织中细胞凋亡明显(图 4)。TAE 组及对照组 AI 分别为 (64.20 \pm 2.77)% 和 (2.20 \pm 1.90)%,差异有统计学意义(t=-112.30, P<0.001)。

3 讨论

人体肝脏接受肝动脉和门静脉双重血供,肝动脉血流阻塞时,门静脉可代偿供血,以维持肝脏正常功能。肝动脉可提供 99% 左右的肝肿瘤供血,为 TAE

治疗 PHC 提供了理论支持^[9]。目前 TAE 已成为无法外科手术切除的中晚期肝癌的有效治疗方法,但由于肝血窦及肝内侧支循环丰富,TAE 治疗时栓塞剂不可避免地进入肿瘤周围正常肝组织并沉积于微小动脉和毛细血管内,导致组织缺血、缺氧,从而使肝组织内产生大量的活性氧,引发一系列复杂的内源性反应,导致肝细胞坏死、凋亡^[10],即使采用超选择性栓塞仍不能避免 TAE 术后肝功能下降。此外,过多的自由基会引起机体产生氧化应激,导致组织损伤。SOD、GSH-PX、CAT 是生物体细胞内产生的天然自由基清除系统^[11],属于酶促抗氧化系统,一方面可阻断体内脂质的过氧化进程,另一方面将有害的脂质过氧化物还原成无害羟基化合物。SOD、GSH-PX、CAT 均可反映生物体去除氧自由基的能力,其中 SOD 最为关键^[12]。肝脏血流被阻断并再重新恢复供应后,产生大量活性氧,具有较活跃的的化学性质,极易与肝细胞膜上的重要功能与结构蛋白发生过氧化反应,从而引起肝细胞损伤和凋亡^[13]。研

表 2 各组癌旁肝组织 SOD、GSH-PX 和 CAT 的测定值(U/mgprot, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD	CAT	GSH-PX
TAE 组(n=13)	21.81 \pm 1.34	1.15 \pm 0.14	187.68 \pm 4.83
对照组(n=12)	45.48 \pm 1.64	3.09 \pm 0.34	262.62 \pm 4.45
t 值	39.693	18.241	40.221
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

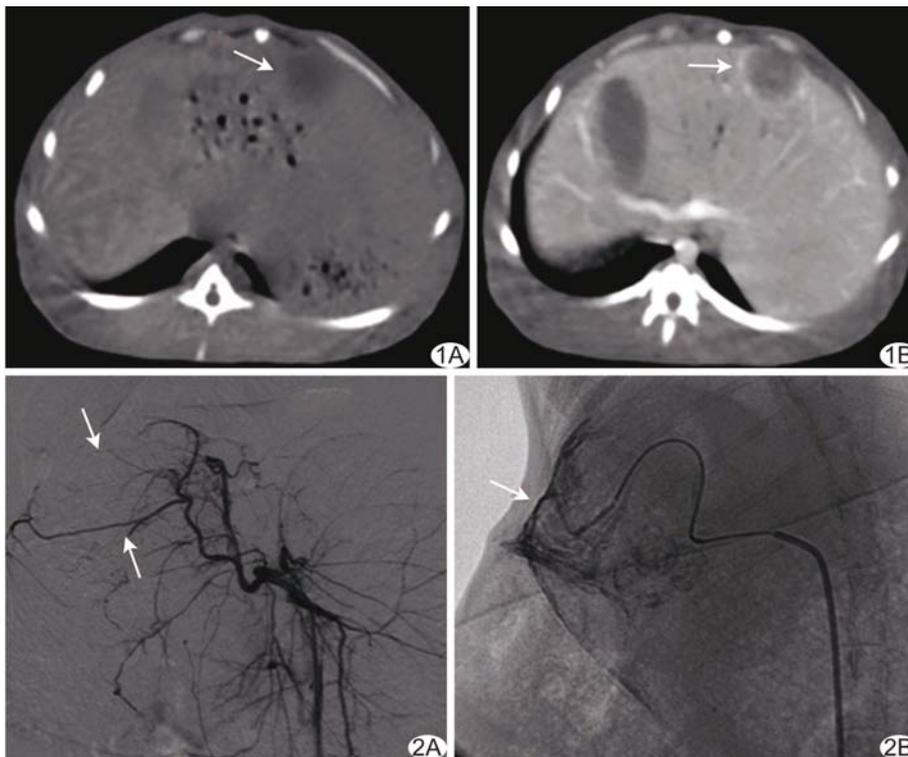


图 1 兔 VX2 肝癌模型 CT 表现 A. CT 平扫示肝实质内不均匀低密度病灶,肿瘤中心密度较低(箭); B. CT 增强扫描可见肿瘤边缘呈不均匀明显强化,中心坏死区无强化(箭) 图 2 兔 VX2 肝癌模型 TAE 术中 DSA 表现 A. 腹腔干造影示肿瘤血管推移呈“抱球征”(箭); B. 超选择性插管至肿瘤供血动脉后推注罂粟乙碘油,可见肿瘤区碘油沉积(箭)

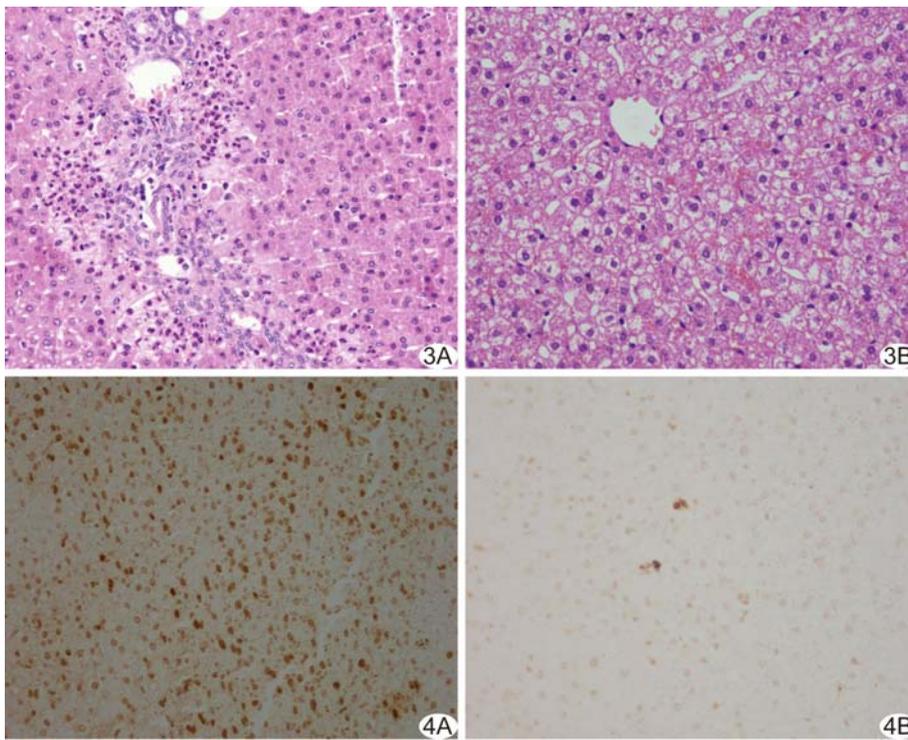


图 3 兔 VX2 肝癌模型离体肿瘤组织标本病理图(HE, ×40) A. TAE 组; B. 对照组 图 4 兔 VX2 肝癌模型离体癌旁肝组织细胞凋亡情况(TUNEL 法, ×40) A. TAE 组; B. 对照组

究^[14]报道, SOD 等能够及时清除组织和细胞内的活性氧, 保护机体免受过氧化损伤。本研究建立兔 VX2 肝癌模型, 探讨 TAE 术后癌旁肝组织中氧化应激及细胞凋亡在癌旁肝组织损伤中的作用, 结果显示 TAE 组癌旁肝组织中 SOD、GSH-PX、CAT 活性较对照组均明显下降, 提示 TAE 术后癌旁肝组织发生氧化应激, 破坏了肝细胞正常的生理功能。

细胞凋亡是机体在发育过程中或某些因素作用下, 通过一系列复杂调控而发生的一种程序性细胞死亡。组织缺血、缺氧, 产生大量氧自由基及肿瘤浸润等病理因素均可导致细胞凋亡。本研究中的 TUNEL 染色结果显示, TAE 组癌旁肝组织 AI 明显高于对照组, 提示细胞凋亡与 TAE 术后肝损伤有关, 与既往研究^[15]结果相符。

由于本实验样本量较小, 加之检测方法的局限性及研究因素不够全面, 对 TAE 术后癌旁肝组织损伤的机制研究不够深入和透彻, 将在今后的研究中进一步分析聚合酶链式反应、免疫印迹、质粒转染和基因敲除等方法对 TAE 术后肝功能的影响。

综上所述, TAE 术后, 兔 VX2 肝癌模型肝细胞缺血、缺氧, 癌旁肝组织发生氧化应激, 且癌旁肝组织中 SOD、CAT、GSH-PX 活性下降而产生的大量氧自由

基使肝细胞凋亡进一步加剧, 最终导致肝功能下降。本实验从活体动物水平观察氧化应激及细胞凋亡在肝组织损伤中的作用, 有利于临床探寻能够安全、有效地减轻 TAE 术后肝损伤的方法。将 SOD 等抗氧化酶作为保护肝功能的靶点, 通过激活酶促抗氧化系统清除过多的氧自由基, 从而减轻 TAE 术后对肝功能的损害, 有望成为今后临床研究的方向之一。

[参考文献]

[1] Omata M, Cheng AL, Kokudo N, et al. Asia-pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: A 2017 update. *Hepatol Int*, 2017, 11(4): 317-370.

[2] Zhang S, Zhang K, Ji P, et al. GABPA predicts prognosis and inhibits metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 2017, 17(1):380.

[3] 张成佳, 何仕诚, 滕皋军, 等. TACE 治疗原发性肝癌对肝功能影响的相关因素分析. *东南大学学报(医学版)*, 2013, 32(1):18-22.

[4] Geschwind JF, Kudo M, Marrero JA, et al. TACE treatment in patients with sorafenib-treated unresectable hepatocellular carcinoma in clinical practice: Final analysis of GIDEON. *Radiology*, 2016, 279(2):630-640.

[5] Su TS, Lu HZ, Cheng T, et al. Long-term survival analysis in combined transarterial embolization and stereotactic body radiation therapy versus stereotactic body radiation monotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma >5 cm. *BMC Cancer*, 2016, 16(1):834.

[6] 王君东, 胡锦涛, 杜伟. 改良方法建立兔 VX2 肝癌模型及其 MRI 表现. *医学理论与实践*, 2013, 26(6):701-702.

[7] 牛焕章, 滕皋军, 邓钢, 等. 兔 VX2 肝癌模型的影像学表现和栓塞技术的实验研究. *中国医学影像技术*, 2006, 22(6):797-800.

[8] 徐涛, 陈孝平, 李丹, 等. CD147 在兔 VX2 模型肿瘤组织的表达及意义. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(1):37-39.

[9] Miki I, Murata S, Uchiyama F, et al. Evaluation of the relationship between hepatocellular carcinoma location and transarterial chemoembolization efficacy. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(35):6437-6447.

[10] 张靓, 杜伟. NF-κB 在肝癌介入治疗后癌旁肝细胞中的表达. 大

理学院学报, 2014, 213(10):42-46.

[11] Shih SC, Ho TC, Chen SL, et al. Pigment epithelium derived factor peptide protects murine hepatocytes from carbon tetrachloride-induced injury. PLoS One, 2016, 11(7):e0157647.

[12] 李文娟, 李明华. 间歇低氧对小鼠肝肾组织 MDA 含量及 SOD 活力的影响. 中国继续医学教育, 2016, 8(1):66-67.

[13] Wang C, Chen K, Xia Y, et al. N-acetylcysteine attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and autophagy in mouse

liver via regulation of the ROS/JNK/Bcl-2 pathway. PLoS One, 2014, 9(9):e108855.

[14] Gil D, Rodriguez J, Ward B, et al. Antioxidant activity of SOD and catalase conjugated with nanocrystalline ceria. Bioengineering, 2017, 4(1):18.

[15] Wang Y, Xiong X, Guo H, et al. ZnPP reduces autophagy and induces apoptosis, thus aggravating liver ischemia/reperfusion injury in vitro. Int J Mol Med, 2014, 34(6):1555-1564.

《中国医学影像技术》杂志 2019 年征订启事

《中国医学影像技术》杂志于 1985 年创刊,是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办的国家级学术期刊。刊号:ISSN 1003-3289, CN 11-1881/R。曾获百种中国杰出学术期刊,现为中国精品科技期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊、《中文核心期刊要目总览》收录期刊、荷兰《医学文摘》收录源期刊、英国《科学文摘》收录源期刊、俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊、WHO《西太平洋区医学索引》(WPRIM)来源期刊、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JSTChina)收录期刊。

《中国医学影像技术》杂志是临床医学影像学与影像医学工程及理论研究相结合的综合性学术期刊,刊登放射、超声、核医学、介入治疗、影像技术学、医学物理与工程学等方面的基础研究及临床实验研究的最新成果。以论文质量优、刊载信息量大、发刊周期短为其特色,是我国影像医学研究探索和学术交流的良好平台。

《中国医学影像技术》为月刊,160 页,大 16 开本,彩色印刷。单价 26 元,全年定价 312 元。订户可随时向当地邮局订阅,邮发代号 82-509;亦可向编辑部直接订阅,免邮寄费(欢迎通过银行转账,附言栏请注明订阅杂志名称)。

联系电话:010-82547903 传真:010-82547903

E-mail:cjmit@mail.ioa.ac.cn 网址:www.cjmit.com

编辑部地址:北京市海淀区北四环西路 21 号大猷楼 502 室 邮编:100190

银行账户名:《中国医学影像技术》期刊社 账号:110907929010201

开户行:招商银行北京分行清华园支行 联系人:杜老师

