

## • 研究生展版 •

## 肝癌经皮酒精注射术后肝再生的研究

李震 胡道予 郭友 夏黎明 冯定义 曾引华

**【摘要】 目的:**研究经皮酒精注射术(PEI)后,周围叶的正常肝脏组织是否存在肝细胞再生,及其再生的特点。

**方法:**VX2 肝癌动物模型兔 50 只,分别行经皮酒精注射术和肝癌肝叶切除术(PH),分别检测术后 24h、72h 的兔肝组织的有丝分裂指数(MI),以流式细胞术(FCM)行 DNA 含量分析,测定 S 期细胞比率(SPF),DNA 指数(DI)的变化。**结果:**PEI 术后 24 小时兔肝有丝分裂指数、S 期细胞比率、DNA 指数较对照组均明显升高( $P < 0.001$ );术后 72h,有丝分裂指数、S 期细胞比率较对照组均无明显差异( $P > 0.05$ ),DNA 指数较对照组升高( $t = 2.78, P > 0.05$ )。并且术后 24h, PEI 术后肝细胞增殖明显弱于肝癌肝叶切除术,各项指标差异明显。**结论:**PEI 术后兔肝组织存在一定程度的再生,弱于肝叶切除术后肝再生,其原因可能与酒精的局限性扩散和肝内酒精浓度升高作用有关。

**【关键词】** 经皮酒精注射术 流式细胞术 肝再生**【中图分类号】** R815, R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2002)02-0167-04

**A study on liver regeneration after percutaneous ethanol injection in hepatic carcinoma** LI Zhen, HU Daoyu, GUO You, et al. The Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030

**【Abstract】 Objective:** To study the perifocal liver regeneration and its characteristics after percutaneous ethanol injection of hepatic carcinoma. **Methods:** Fifty rabbits with VX2 liver tumor undergoing percutaneous ethanol injection and hepatic lobectomy, were measured 24h and 72h later the mitosis index(MI), S-phase cell fraction (SPF) and DNA index (DI) of the normal liver tissue by the flow cytometry (FCM). **Results:** MI, SPF and DI of the rabbit with VX2 liver tumor at 24h postoperatively, were significantly different from those of the control group ( $P < 0.001$ ), 72h later MI and SPF of VX2 liver tumor were not significantly different from those of the control group ( $P > 0.05$ ), but DI of VX2 liver tumor was higher than that of the control group ( $t = 2.78, P < 0.05$ ). Moreover, the proliferation of the liver cells of the rabbit treated by PEI was less than that by hepatic lobectomy, and all the indexes were significant different between those two treated groups. **Conclusion:** The liver regeneration of the rabbit with VX2 liver tumor after PEI is weaker than that by hepatic lobectomy, and after the cause may be associated with the local diffusion and high concentration of the ethanol in the liver.

**【Key words】** Percutaneous ethanol injection Flow cytometry Liver regeneration

经皮酒精注射术(PEI)是治疗肝癌常用的方法。但由于绝大多数患者伴有肝纤维化、肝功能不良以及酒精对肿瘤周围正常肝组织的难以避免的损害,由此可能加重肝衰竭。肝癌介入治疗后患者的预后和肝细胞坏死的程度和再生能力有关。阻止肝坏死目前研究较为深入,对促进肝再生的研究,临床上多集中在肝癌切除术后的患者,肝部分切除术后肝再生已经得到广泛的公认<sup>[1~3]</sup>。而经皮酒精注射术(PEI)作为一种内科性的肝部分切除,术后是否存在类似的机制目前尚未见报道。我们采用兔 VX2 肝癌的动物模型,行经皮酒精注射术,检测相邻肝叶肝细胞是否存在再生。

## 材料和方法

## 1. 实验动物模型的建立

日本大白兔 50 只,体重 2.6~3.3Kg,由同济医学院实验动物中心提供。

取传代的 VX2 兔癌细胞株,切成 1mm<sup>3</sup> 大小的组织块。

作者单位: 430030 湖北省,华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科  
作者简介: 李震(1976~),男,黄石人,研究生,主要从事放射介入工作。

将兔麻醉,剖腹直视下将组织块接种于肝包膜下,其上覆以小块明胶海绵。接种成功后饲养 3 周。

## 2. PEI 治疗及影像学检查

随机将动物分成五组。即空白对照组(A组),PEI 治疗组 1(B组)和 2(C组),肝癌肝叶切除术组 1(D组)和 2(E组),每组 10 只。接种成功 3 周后将兔麻醉。在磁共振监视下行肿瘤穿刺,按照肿瘤直径每 1cm 给 1ml 的剂量注入无水乙醇;D 组与 E 组兔行肝叶肝癌切除术,即切除肿瘤所在的肝叶(左叶或右叶)。

## 3. 标本的采集和处理

术后第一天处死 A 组、B 组和 D 组,第三天处死 C 组和 E 组。处死后立即取出肝脏,切下小块无肿瘤肝叶的肝组织,剥离肝包膜及肝内结缔组织,以 0.01M 的 PBS 洗净血液后剪碎。加入消化液消化,置入 4℃ 冰箱过夜后中止消化。离心,弃上清,80% 冰乙醇固定,置 -20℃ 冰箱过夜。固定后细胞用 PBS 洗涤两次,于 40ul PC 中冰上孵育 30min,加 10mg/l 的碘化丙锭(PI)100ul 和 0.1% RNA 酶(RnaseA)50ul。室温下 DNA 染色 20 分钟,待流式细胞术分析。<sup>[1,3]</sup>

将剩余肝组织照像,测定肿瘤大小,观察形态变化。取下小块无肿瘤肝叶的肝组织,40% 福尔马林固定,HE 染色制片。

## 4. 流式细胞术分析(Flow cytometry, FCM)

经上述处理后的细胞,荧光标记成功后应用 FAC Sort 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)进行检测,激光激发波长 488nm,发射波长 620nm。应用 Cellquest 软件,对所测细胞进行分析<sup>[3]</sup>。

## 5. 观察及测定项目

B 组和 C 组兔 PEI 术前行 MRI 薄层扫描,观察乙醇弥散情况。

大体病理检测肝肿瘤的大小及生长状况和乙醇扩散情况。

病理切片在光学显微镜(Olympus)下有丝分裂计数,油镜下计算每 1000 个细胞中处于有丝分裂期的肝细胞所占比例作为有丝分裂指数(MI)。

流式细胞术分析行 DNA 含量分析,计算 S 期细胞比例(SPF):  $SPF = S / (S + G_1/G_0 + G_2/M) \times 100\%$

DNA 指数(DI):  $DI = \text{实验组 } G_1/G_0 \text{ 期的比例} / \text{对照组 } G_1/G_0 \text{ 期的比例} \times 100\%$

细胞周期时像:  $G_1/G_0$  期 S 期  $G_2/M$  期

6. 统计学分析:所有数据采用  $t$  检验。

## 结 果

## 1. 大体病理学及影像学改变:

3 周末兔 VX2 肝癌呈白色结节状,接近肝表面,直径为  $3.4 \pm 1.5\text{cm}$ ,肿瘤组织与正常肝组织分界不清,经皮酒精注射术后肿瘤周围部分肝组织被酒精浸润坏死,呈白色,界限清晰。MRI 示肿瘤呈结节样改变,  $T_1$  加权像显示肿瘤低信号改变,  $T_2$  加权像显示肿瘤为高信号,注入酒精后周围组织信号无明显降低(图 1)。

## 2. 细胞学变化:

光镜下肝组织细胞固定良好,形态正常,可以见到清晰的有丝分裂,计算有丝分裂指数(MI)。在荧光显微镜下可以清楚的看到肝细胞分离成单个、固定及染色良好,并发出红色的荧光(图 2)。流式细胞仪检测,术后第一天,PEI 治疗组和肝癌肝叶切除术组 S 期、 $G_2/M$  期细胞均有增多(图 3),术后第 3 天,PEI 治疗组和肝癌肝叶切除术组 S 期、 $G_2/M$  期细胞均较对照组无明显变化(图 4)。

(1) 术后第 1 天:PEI 治疗组与对照组的有丝分裂指数(MI)、S 期所占比例(SPF)、DNA 指数(DI)的测定结果进行前后配对  $t$  检验结果见表 1。肝癌肝叶切除术组与 PEI 治疗组的以上各指标的测定结果进行前后配对  $t$  检验结果见表 2,各指标均明显升高( $P < 0.05$ )。

(2) 术后第 3 天:PEI 治疗组与对照组的各指标进行前后配对  $t$  检验结果见表 3。肝癌肝叶切除术组与 PEI 治疗组的以上各指标的测定结果进行前后配对  $t$  检验结果见表 4。

表 1 术后第 1 天 PEI 组与对照组 MI、SPF、DI 的  $t$  检验结果

| 指标     | PEI 组            | 对照组             | $t$ 值 | $P$ 值       |
|--------|------------------|-----------------|-------|-------------|
| MI(%)  | $1.51 \pm 0.32$  | $0.51 \pm 0.21$ | 8.26  | $p < 0.001$ |
| SPF(%) | $14.79 \pm 3.60$ | $4.90 \pm 1.76$ | 7.80  | $p < 0.001$ |
| DI     | $0.83 \pm 0.02$  | 1 *             | 8.76  | $p < 0.001$ |

\* 以正常对照组的 DI 值为 1, DI 的正常范围为 0.9—1.1

表 2 术后第 1 天 PEI 组与肝叶切除术组的 MI、SPF、DI 的  $t$  检验结果

| 指标     | PEI 组            | 肝叶切除术组           | $t$ 值 | $P$ 值       |
|--------|------------------|------------------|-------|-------------|
| MI(%)  | $1.51 \pm 0.32$  | $3.31 \pm 0.54$  | 8.16  | $p < 0.001$ |
| SPF(%) | $14.79 \pm 3.60$ | $21.76 \pm 5.92$ | 3.18  | $p < 0.01$  |
| DI     | $0.83 \pm 0.02$  | $0.75 \pm 0.03$  | 2.90  | $p < 0.01$  |

表 3 术后第 3 天 PEI 组与对照组的 MI、SPF、DI 的  $t$  检验结果

| 指标     | PEI 组           | 对照组             | $t$ 值 | $P$ 值      |
|--------|-----------------|-----------------|-------|------------|
| MI(%)  | $0.61 \pm 0.24$ | $0.51 \pm 0.21$ | 0.99  | $p > 0.05$ |
| SPF(%) | $5.66 \pm 1.98$ | $4.90 \pm 1.76$ | 0.91  | $p > 0.05$ |
| DI     | $0.95 \pm 0.02$ | 1               | 2.78  | $p < 0.05$ |

表 4 术后第 3 天 PEI 组与肝叶切除术组的  $t$  检验结果

| 指标     | PEI 组           | 肝叶切除术组          | $t$ 值 | $P$ 值      |
|--------|-----------------|-----------------|-------|------------|
| MI(%)  | $0.61 \pm 0.24$ | $0.81 \pm 0.30$ | 1.61  | $p > 0.05$ |
| SPF(%) | $5.66 \pm 1.98$ | $6.62 \pm 1.56$ | 1.16  | $p > 0.05$ |
| DI     | $0.95 \pm 0.02$ | $0.98 \pm 0.01$ | 2.03  | $p > 0.05$ |

## 讨 论

经皮酒精注射术(PEI)是目前治疗肝癌常用的方法之一,尤其是对单发、多发的小结节型肝癌有独特的疗效。但是绝大多数肝癌患者同时伴有肝纤维化、肝功能不良以及酒精对肿瘤周围正常肝组织的损害,由此必定会加重肝衰竭。在外科肝癌切除术的患者中,术式的选择,切除范围的大小,不仅取决于肿瘤本身,更大程度上依赖于患者的肝脏功能,尤其是残余肝细胞的状况。不适当的扩大手术范围只会导致患者肝衰竭而死亡。因此,肝癌切除术后残余肝细胞的再生能力往往决定了患者的预后。术前如果能够预估患者的肝再生能力,可以适当扩大或缩小手术范围,以提高患者的生存质量。经皮酒精注射术(PEI)作为一种内科性的肝部分切除,也存在着同样的问题。因为肿瘤的形状往往不规则,注射扩散的范围难以迅速仔细观察界定,过大的剂量注射可能也会导致肝衰竭。所以酒精注射治疗方案的选择、患者的预后与患者的残余肝组织的功能也密切相关。目前对于这一问题的研究尚少,酒精注射术后是否存在肝再生也不清楚,这种再生是否与外科切除术后的肝再生有着相似的意义,这些问题的探讨对指导治疗方案,改善患者预后有着极其重要的意义。

肝部份切除术后肝再生是一种代偿性增生。肝细胞再生是通过激发成熟的处于休眠期的肝细胞再次进入细胞增殖循环而发生的。其过程是<sup>[1]</sup>:鼠肝 70% 部分切除术后,术后 12h 细胞内 RNA 与蛋白质升高,24h DNA 复制到达高峰,并开始有丝分裂;72h 后再生过程明显减弱而停止。并且,肝再生的强度与切除的多少密切相关。10% 的肝切除无明显增生,10%~30% 增生微弱,30% 以上明显增生,30% 以上随着切除范围的扩大增生更强。至 70% 到达顶峰。其后随着切除范围的扩大再生减弱,出现急性肝衰竭,切除 85% 的肝脏时动物死亡。而目前评价肝再生最为确切的方法是直接检测细胞 DNA 的变化和有丝分裂状况。本实验取非肿瘤肝叶的正常组织,在油镜

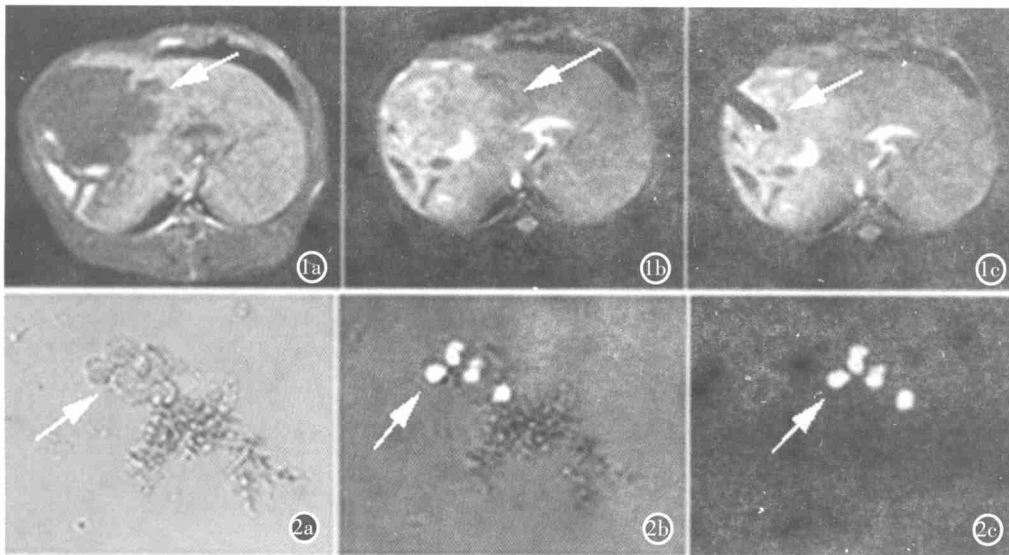


图1 兔肝肿瘤 MRI 表现, 示肿瘤呈结节样改变。a)  $T_1$  加权像, 显示肿瘤呈低信号改变, 边界较为清楚(箭)。b)  $T_2$  加权像, 显示肿瘤为高信号, 肿瘤中间信号高低不甚均匀。c) 磁共振穿刺针插入(箭), 注入酒精后周围组织信号无明显降低。

图2 在荧光显微镜下可以清楚的看到肝细胞分离成单个、固定及染色良好, 并发出红色的荧光(箭)。a) 未以激光激发时像, 清楚的看到肝细胞分离成单个。b) 激发后胞核内 DNA 发出红色的荧光, 胞浆内无荧光。c) 中只显示荧光部分。

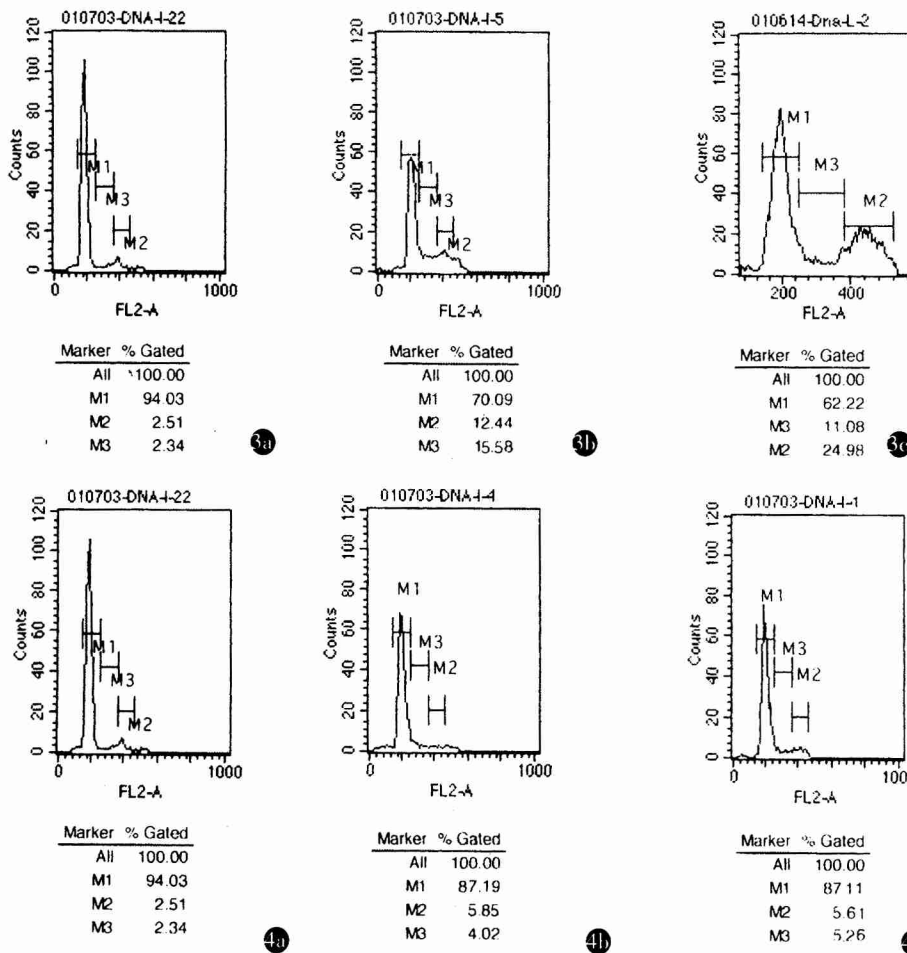


图3 a) 术后第1天对对照组 S 期、 $G_2/M$  期细胞比例较小。b) PEI 治疗组 S 期、 $G_2/M$  期细胞均增多, 肝癌肝叶切除术组 S 期、 $G_2/M$  期细胞增多更明显。(M<sub>1</sub> 为  $G_0/G_1$  期细胞比例, M<sub>2</sub> 为  $G_2/M$  期细胞的比例, M<sub>3</sub> 为 S 期细胞的比例)。

图4 a) 术后第3天对对照组 S 期、 $G_2/M$  期细胞比例较小。b) 为 PEI 治疗组 S 期、 $G_2/M$  期细胞均无明显增多, 肝癌肝叶切除术组 S 期、 $G_2/M$  期细胞数无明显改变。

下计算有丝分裂指数(MI), MI 值越大, 表明肝细胞增生越活跃。流式细胞术测定处于不同时期的肝细胞在所有周期内肝细胞中所占的比例, 即  $G_1/G_0$ 、S、 $G_2/M$  各期所占的比例大小。S 期细胞比例的升高反映了 S 期细胞的增多, 即更多的细胞位于 DNA 合成增殖阶段, 所以 SPF 是反映肝再生的直接指标。DNA 指数的含义是实验组  $G_0/G_1$  期细胞比例与对照组  $G_0/G_1$  期细胞比例之比, 其正常范围为 0.9~1.1。

结果显示: PEI 术后第一天, SPF 较对照组明显升高 ( $t=7.80, P<0.001$ ); DNA 指数  $0.83 \pm 0.02$  也超过正常范围 (0.9~1.1), 较对照组变化明显, 具有统计学意义 ( $t=8.76, P<0.001$ ); 有丝分裂指数也升高, 变化显著 ( $t=8.26, P<0.001$ , 表 1)。由此证实了 PEI 术后确实存在肝组织的再生。结合表 2, 可以发现术后第一天肝肿瘤肝叶切除术后肝细胞再生, 在所有的指标中均要显著强于 PEI 术后肝细胞再生。

兔肝叶切除相当于切除了约 40% 肝脏, 术后第一天(24h) 肝细胞再生 DNA 复制十分显著, 与前人的研究相符合。PEI 术后的肝再生可能与肝再生发生的机制和 PEI 术的特点有关。根据肝再生的细胞表面调节物—损伤素—肝细胞生长因子学说: 一方面, PEI 术后, 酒精浸润的局部细胞发生坏死, 因为所有坏死凋亡的肝细胞都能诱导血中肝内损伤素(Injuri)的产生, Matsumoto K<sup>[4]</sup> 认为损伤素是一种耐热耐酸, 分子量为 10~30KD 的蛋白质, 它在肝损伤后 3—6h 明显升高, 使远离损伤肝的器官(如肺脏)内的 HGF mRNA 增加, 使血中肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor, HGF)的浓度和活性增加, HGF 作为强大的促有丝分裂原启动肝再生。另一方面, 损伤使肝细胞失去紧密接触, 致细胞表面调节物(Cell Surface Molecule, CSM)降低, 失去 CSM 的细胞间接触抑制作用(Contact Inhibition), 使得细胞对各种促有丝分裂原反应增加, 近来研究发现, 它还能使蛋白激酶 C 等在 2~3 天达到顶峰, 组织蛋白合成增加<sup>[5]</sup>。另外, PEI 术后一过性肝功能的不良, 使机体组织自生对肝功能的需要也能促进肝再生。这是 PEI 术后肝再生发生可能的机制。但是, PEI 术只是作用于肿瘤及其周边 1—2cm 正常肝组织区域<sup>[6]</sup>, 内科性的肝部分切除的范围小于肝叶切除术, 切除的范围小, 再生弱。可能还有较低浓度的酒精停留于周围肝脏内, 而急性酒精暴露本身可通过抑制  $\gamma$ -氨基丁酸转移蛋白的转录激活区抑制肝细胞再生<sup>[7]</sup>。使得术后第一天 PEI 术后肝细胞再生要弱于肝癌肝叶切除术后肝细胞再生。

PEI 术后第三天, 肝再生指标中有丝分裂指数、S 期细胞比例均与对照组无明显差异( $P>0.05$ ), DNA 指数虽然单纯从统计学上分析, 与对照组差异明显( $t=2.78, P<0.05$ )。但是, DI 值本身为  $0.95 \pm 0.02$ , 在正常范围(0.9~1.1)之内, 没有实际的临床意义。可以认为 PEI 术后第三天肝再生已经停止, 统计学上的差异考虑为抽样误差所致。而术后第三天 PEI 治疗组与肝癌肝叶切除术组之间无明显差异( $P>0.05$ )(表 4)。由此可以看出, 肝叶切除术组此时也无明显再生, 这与前人的结论基本一致。PEI 术后第三天肝组织的再生过程也已基本停止。此时有丝分裂已基本完成, 大部分细胞又进入了休眠期( $G_0$  期)。

总之, 与肝部份切除术相比, PEI 术后肝再生较为微弱。其原因可能是 PEI 作用的范围较小, 未及整个肝叶, 加上酒精本身可以抑制肝细胞再生的共同作用结果。

本实验通过对经皮酒精注射术(PEI)后的患者肝再生的研究, 说明了术后确实存在较肝部份切除术为微弱的再生。它的意义在于, 可以认为在临床 PEI 术因其作用的范围较为局限,

对于非肿瘤肝脏组织的影响较小, 作用较为微弱, 不会明显的影响患者的预后, 是一种较为安全的治疗方法。但是, 本实验结果也同样证明了 PEI 术也会对正常肝脏细胞产生了相当的损伤作用。目前有人提出较大的肿瘤也可以采用 PEI 术治疗, 并加大剂量。这一方法也有可能导致肝衰竭的发生, 并且大量酒精的急性损伤抑制肝再生的过程, 加大肝衰竭的可能。因此, 严格的把握适应症, 避免盲目加大酒精注射的剂量是完全必要的, 这有利于提高患者的生存质量。但移植瘤中肝组织没有 PHC 中常见的肝硬化的基础病变, 肝硬化后的再生显然与非硬化肝脏的再生有着一定的不同。Yamanaka N 等<sup>[8]</sup>发现肝切除术后, 伴有肝硬化的肝再生为不完全再生, 肝再生的速度受肝脏伴随疾病的影响。因此, 对肝癌伴不同程度的肝硬化的 PEI 术后肝再生的研究还有待今后进一步探讨。

#### 参考文献

- 1 朱继红, 成令忠, 钟翠平, 等. 应用流式细胞计对大鼠肝大部切除术后肝细胞增殖周期动态的研究[J]. 解剖学报, 1988, 18(3): 433-438.
- 2 Mann DV, Lam WW, Hjelm NM, et al. Human liver regeneration: hepatic energy economy is less efficient when the organ is diseased [J]. Hepatology, 2001, 34(3): 557-565.
- 3 Fujimoto JMP, Okamoto E, Yamanaka N, et al. Flow cytometry DNA analysis of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 1991, 67(5): 939-943.
- 4 Matsumoto K, Tajima H, Hamanoue M, et al. Identification and characterization of "injurin," an inducer of expression of the gene for hepatocyte growth factor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(9): 3800-3804.
- 5 Takaki Y, Hirai S, Manabe N, et al. Dynamic changes in protein components of the tight junction during liver regeneration [J]. Cell Tissue Res, 2001, 305(3): 399-409.
- 6 Livraghi T, Bolondi I, Lazzaroni S, et al. Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis [J]. Cancer, 1992, 69(5): 925-931.
- 7 Zhang MN, Gong Y, Minuk GY. The effects of acute ethanol exposure on inhibitors of hepatic regenerative activity in the rat [J]. Mol Cell Biochem, 2000, 207(4): 109-114.
- 8 Yamanaka N, Okamoto E, Kawamura E, et al. Dynamics of normal and injured human liver regeneration as assessed on the basis of computed tomography and liver function [J]. Hepatology, 1993, 18(1): 79-85.

(2001-10-30 收稿)