

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00495

## 缺血再灌注损伤促进裸鼠肝癌生长及癌旁组织 VEGF 和 MMP-9 表达

艾莉<sup>△</sup>, 张小峰<sup>△</sup>, 刘鹏, 陈磊, 胡和平\*

第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗科, 上海 200438

**[摘要]** **目的:**观察缺血再灌注损伤对裸鼠肝癌生长及癌旁组织转移复发相关基因(VEGF、MMP-9)表达的影响。**方法:**将人肝癌细胞 Hep3B 原位种植于裸鼠肝脏制备荷肝癌裸鼠模型, 荷瘤裸鼠随机分为缺血再灌注后 1 h、6 h、5 d、7 d 及假手术组 ( $n=8$ ), 缺血再灌注组荷肝癌裸鼠采用肝门阻断法制备缺血再灌注损伤模型, 假手术组不阻断肝门血供, 其余同缺血再灌注组。缺血再灌注后 1 h、6 h 检测裸鼠肝功能(ALT、AST)的变化 ( $n=8$ ); 实时荧光定量 PCR 检测癌旁组织 VEGF 和 MMP-9 mRNA 的表达, 并与正常对照组作比较 ( $n=6$ )。缺血再灌注后 5 d、7 d 取肝组织, H-E 染色观察肝组织病理学变化, 计算肿瘤周边变性坏死区域 ( $n=6$ )。剩余荷瘤裸鼠于缺血再灌注后 2 周处死取肿瘤, 测定缺血再灌注组及假手术组裸鼠肿瘤体积及质量。**结果:**术后 2 周缺血再灌注组肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )及质量(g)明显高于假手术组 [ $(209.6 \pm 25.74)$  vs  $(330.6 \pm 32.01)$ ,  $(0.214 \pm 0.036)$  vs  $(0.374 \pm 0.045)$ ,  $P < 0.01$ ]。缺血再灌注后 1、6 h 裸鼠血浆 ALT 和 AST 增高, 明显高于假手术组 ( $P < 0.01$ )。H-E 染色结果表明再灌注后 5 d 肿瘤周边组织炎症细胞浸润、变性坏死区域较假手术组更明显 ( $P < 0.05$ ); 再灌注后 7 d 肿瘤周边变性坏死区域较 5 d 减少 ( $P < 0.05$ ), 但变性坏死区域被肿瘤细胞浸润代替。荧光定量结果表明, 缺血再灌注后 1 h 和 6 h 癌旁组织 VEGF 和 MMP-9 mRNA 表达明显高于假手术组 ( $P < 0.01$ ), 且二者表达具有一定相关性 ( $r=0.418$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**肝门阻断所导致的缺血再灌注损伤加速了裸鼠肝肿瘤细胞的生长, 促进了癌旁组织中转移复发相关基因(VEGF、MMP-9)的表达。

**[关键词]** 肝肿瘤; 缺血再灌注; VEGF; MMP-9

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0495-04

## Ischemia-reperfusion promotes hepatic cancer growth and expression of VEGF and MMP-9 in adjacent tissues of cancer in nude mice

AI Li<sup>△</sup>, ZHANG Xiao-feng<sup>△</sup>, LIU Peng, CHEN Lei, HU He-ping\*

Department of Comprehensive Treatment, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the influence of ischemia-reperfusion (I/R) on hepatoma growth and on the expression of genes associated with tumor metastasis and recurrence (VEGF and MMP-9) in the adjacent tissues of cancer in nude mice. **Methods:** BALB/c nude mouse model bearing Hep3B-tumor in the liver was established and the model mice were evenly randomly into 5 groups: sham group and ischemia/reperfusion 1 h, 6 h, 5 d, and 7 d groups ( $n=8$ ). I/R models were established by blocking porta hepatic; the sham group underwent the same treatment as the I/R model group except for blocking of porta hepatic. ALT and AST were detected in I/R 1 h and 6 h groups. Real-time-PCR was employed to detect the change of VEGF and MMP-9 in the adjacent tissues of cancer and the results were compared with that of the control group ( $n=6$ ). Histopathological changes of liver were studied by H-E staining and necrotic areas were calculated in I/R 5 d and 7 d groups ( $n=6$ ). The remnant tumor bearing mice were sacrificed 2 weeks after I/R to measure the volume and mass of the tumors. **Results:** Two weeks later, the tumor volume and mass in I/R group were increased compared with those in the sham group [ $(209.6 \pm 25.74)$   $\text{mm}^3$  vs  $(330.6 \pm 32.01)$   $\text{mm}^3$ ,  $[0.214 \pm 0.036]$  g vs  $[0.374 \pm 0.045]$  g,  $P < 0.01$ ]. Levels of ALT and AST were significantly elevated in I/R 1 h and 6 h groups compared with those in the sham group ( $P < 0.01$ ). H-E staining showed that the infiltration of inflammatory cells around the tumors and the areas of necrosis became more prominent 5 days after I/R

**[收稿日期]** 2008-03-18 **[接受日期]** 2008-04-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30772512). Supported by National Natural Science Foundation of China(30772512).

**[作者简介]** 艾莉, 硕士生, E-mail: alic. ai1223@163.com; 张小峰, 硕士生, E-mail: zxf\_ghbh@126.com

<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors)

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070785, E-mail: hp-hu@medmail.com.cn

compared with the sham operation group ( $P < 0.05$ ). The necrosis area was reduced 7 days after I/R compared with 5 days after I/R ( $P < 0.05$ ); however, the necrosis area was replaced by invasion of tumor cells ( $P < 0.05$ ). It was found that the expression of VEGF and MMP-9 mRNA was higher in the adjacent tissues of cancer after I/R than that in the sham group ( $P < 0.01$ ), and the expression of the 2 was correlated with each other ( $r = 0.418, P < 0.01$ ). **Conclusion:** I/R induced by blocking porta hepatic can accelerate tumor cell growth and promote expression of VEGF and MMP-9 in the adjacent tissues of cancer.

[KEY WORDS] liver cancer; ischemia/reperfusion; VEGF; MMP-9

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 495-498]

目前,原发性肝癌的首选治疗方法仍是手术切除<sup>[1]</sup>。在复杂的肝脏外科手术中,为有效控制术中出血,不可避免地需要阻断入肝血流,但肝脏血流的阻断不可避免导致缺血再灌注(ischemia-reperfusion injury, I/RI),损害残肝增殖修复能力,甚至诱发肝功能衰竭<sup>[2]</sup>。国内外不少研究<sup>[3-4]</sup>认为肝脏缺血再灌注除具有组织损伤的不利作用外,对肿瘤组织可能还具有杀伤和治疗作用,且肿瘤组织对缺血再灌注损伤较正常肝组织更为敏感。但 Nicoud 等<sup>[5]</sup>的最新研究发现缺血再灌注损伤会促使余肝出现肉眼未见微小肿瘤病灶生长和增加微小病灶的侵袭转移,可能会促进肿瘤的复发和转移。相关研究仍有争议,值得进一步深入探讨。血管内皮细胞生长因子(VEGF)与基质金属蛋白酶-9(MMP-9)是目前肿瘤复发转移相关研究的热点<sup>[6]</sup>。本研究采用原位种植法制备裸鼠肝脏模型,荷肝癌裸鼠采用肝门阻断法诱导缺血再灌注损伤,观察缺血再灌注损伤对裸鼠肝脏肿瘤生长及癌旁组织 VEGF 和 MMP-9 表达的影响,为临床进一步探讨肝脏血流阻断对肿瘤复发的影响及改进手术方式奠定基础。

### 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 DMEM、胎牛血清(Gibco 公司);戊巴比妥钠(Sigma 公司);总 RNA 提取、逆转录相关试剂(Invitrogen 公司);PCR 产物试剂和引物(上海申能博彩生物公司);ABI7300 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司);诊断用酶盒(南京建成生物工程研究所);SYBR Green I 荧光染料(TaKaRa 公司);肝癌细胞株 Hep3B 由本院分子肿瘤实验室殷正丰教授惠赠。

1.2 肝癌裸鼠模型的建立 雄性 BALB/c 裸鼠 50 只,体质量 20~22 g,由中国科学院上海实验动物中心提供。将人肝癌细胞 Hep3B 悬液分别皮下接种于裸鼠背部,接种 100  $\mu$ l( $5 \times 10^6$  个细胞)。待肿块长至直径约 1 cm 时剖出肿瘤组织剪成小块备用。裸鼠用 0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉后,行上腹正中切口,暴露肝脏,将上述剪成小块后的瘤组织用接种针植入中肝叶,垒层关腹,制备裸鼠肝癌模型。

1.3 荷瘤裸鼠的分组及处理 3 周后,荷瘤裸鼠随机分为:缺血再灌注组( $n = 32$ )及假手术组( $n = 8$ )。缺血再灌注组裸鼠按观察时间点(再灌注后 1 h、6 h、5 d、7 d)再随机分为 4 组( $n = 8$ )。缺血再灌注组裸鼠经 0.3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉,参照 van-der-Bilt 等<sup>[7]</sup>的方法建立荷瘤裸鼠肝脏局部缺血再灌注模型,具体步骤:用无创小血管夹阻断中肝叶及左肝叶血流,造成 70%肝脏缺血,但不阻断右肝叶血流,以防门静脉和胃肠道淤血,肝脏缺血 45 min 后,恢复血液灌注后关腹。假手术组不阻断肝门血供,其余同上。

1.4 肝脏酶学的检测 缺血再灌注损伤后 1 h 和 6 h 组裸鼠尾静脉取血( $n = 8$ ),按试剂盒说明,14 000 r/min( $r = 9.5$  cm)离心 10 min,应用诊断用酶试剂盒检测各组血浆谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST),并与假手术组作对照。

1.5 实时荧光定量-PCR 检测癌旁组织 VEGF 和 MMP-9 mRNA 的表达 缺血再灌注损伤后 1 h 和 6 h 组处死裸鼠( $n = 6$ ),取肝癌癌旁组织,抽提组织总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 抽提液浓度为 1.5  $\mu$ g/ $\mu$ l。RNA 样品 -80 $^{\circ}$ C 保存。根据 GenBank 人源 VEGF 和 MMP-9 mRNA 序列(No. NM 001025366, NM 004994),以  $\beta$ -actin 作内参照,采用 Primer Express 软件设计引物。具体引物序列如下:VEGF 正义 5'-CCC ACT GAG GAG TCC AAC AT-3',反义 5'-TTT CTT GCG CTT TCG TTT TT-3',扩增片段 186 bp;MMP-9 正义 5'-TTG ACA GCG ACA AGA AGT GG-3',反义 5'-GCC ATT CAC GTC GTC CTT AT-3',扩增片段 133 bp; $\beta$ -actin 正义 5'-TCC ACG AAA CTA CCT TCA ACT CCA-3',反义 5'-GTG ATC TCC TTC TGC ATC CTG TCG-3',扩增片段 179 bp。反应体系:总体积为 25  $\mu$ l,包括 cDNA 2  $\mu$ l,10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ l,10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ l, *Taq* 酶 2.5 U,100 mmol/L 引物及荧光染料各 0.1  $\mu$ l,加双蒸水至 25  $\mu$ l。PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 2 min 后,以 95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 12 s 循环 40 次。取目的基因 PCR 产物各 10  $\mu$ l 及内参 RT-PCR 产物各 5  $\mu$ l,1.5%琼脂糖凝胶电泳,

稳压 5 V/cm 约 1.5 h, 凝胶在 UVP 自动成像系统中扫描, 观察结果并存档。BandScan4.3 软件分析电泳带, 计算目的基因与内参照扩增带灰度值之比, 即得目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.6 H-E 染色病理学观察 取缺血再灌注后 5 d、7 d 及假手术组裸鼠肝癌组织, 固定于 4% 多聚甲醛 24 h 以上, 制成 10 mm×10 mm×5 mm 的组织块进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片和脱蜡, 再行 H-E 染色。在高倍视野下计数 H-E 染色切片变性坏死细胞占正常肝细胞和肿瘤细胞的百分比, 计数至少 50 个视野, 取所有视野下比值的平均值。

1.7 荷瘤裸鼠肿瘤质量及体积的测定 剩余荷瘤裸鼠再灌注后 2 周处死, 取肝脏肿瘤组织, 电子天平称瘤质量, 游标卡尺测量瘤结节最长径(a)、最短径(b), 按公式  $V=0.5 \times a \times b^2$  计算瘤体积。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件, 显著性检验采用独立样本 *t* 检验和 ANOVA。VEGF 与 MMP-9 mRNA 表达相关性采用 Pearson 相关分析。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 荷肝癌裸鼠的制备情况 裸鼠肝实质中接种 Hep3B 瘤块 3 周后, 打开裸鼠腹腔, 约 80% 的裸鼠肉眼可见肝脏荷瘤直径约 0.5 cm, 各荷瘤裸鼠间肿瘤大小无统计学差异。

2.2 肿瘤体积及质量的比较 术后 2 周假手术组、缺血再灌注组肿瘤体积分别为  $(209.6 \pm 25.74) \text{ mm}^3$  和  $(330.6 \pm 32.01) \text{ mm}^3$ , 肿瘤质量分别为  $(0.214 \pm 0.036) \text{ g}$  和  $(0.374 \pm 0.045) \text{ g}$ 。统计学分析结果表明, 缺血再灌注组与假手术组之间差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

2.3 肝功能的检测结果 再灌注后 1 h, 缺血再灌注组裸鼠血浆 ALT 和 AST 增高, 再灌注后 6 h ALT 和 AST 升高更显著 ( $P<0.01$ ); 而假手术组术后血浆 ALT 和 AST 无明显变化 ( $P>0.05$ )。缺血再灌注组术后 1 h、6 h 血浆 ALT 和 AST 水平均明显高于假手术组, 差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ , 图 1)。

2.4 H-E 染色观察结果 结果显示, 再灌注后 5 d 缺血再灌注组裸鼠肝脏肿瘤周边组织炎症细胞浸润、变性坏死区域较假手术组更明显, 两组肿瘤周边变性坏死区域分别为  $(24.3 \pm 4.22)\%$  和  $(6.0 \pm 2.84)\%$ , 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。再灌注后 7 d 缺血再灌注组裸鼠肝脏肿瘤周边变性坏死区域为  $(15.8 \pm 3.41)\%$ , 较再灌注后 5 d 明显减少 ( $P<0.05$ ), 肿瘤周边变性坏死区域被肿瘤细胞浸

润、代替(图 2)。

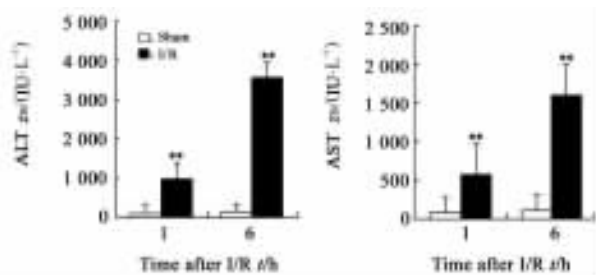


图 1 荷瘤裸鼠术后肝功能的变化

Fig 1 Changes of hepatic function of tumor-bearing mice after operation

\*\*  $P<0.01$  vs Sham group

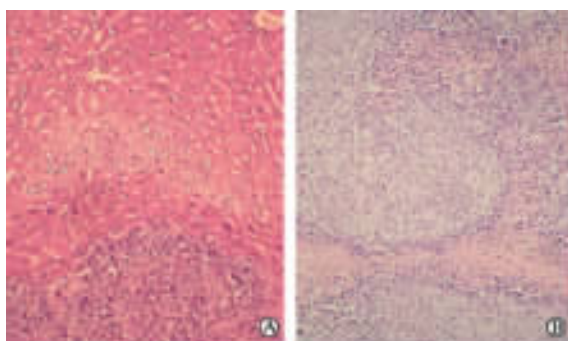


图 2 裸鼠肝肿瘤组织 H-E 染色

Fig 2 H-E staining of tumor tissues of nude mice

A: Sham-operation; B: 7 d after I/R. Original magnification:  $\times 200$

2.5 癌旁组织 VEGF 和 MMP-9 mRNA 的表达 实时荧光定量 PCR 检测发现, 与假手术组相比, 缺血再灌注后 1 h 裸鼠癌旁组织 VEGF 和 MMP-9 mRNA 表达明显升高 ( $P<0.01$ ), 再灌注后 6 h 癌旁组织 VEGF 和 MMP-9 mRNA 升高更为显著 ( $P<0.01$ , 图 3)。Pearson 相关分析结果表明: 癌旁组织中 VEGF 和 MMP-9 mRNA 表达呈一定的正相关性 ( $r=0.418, P<0.01$ )。

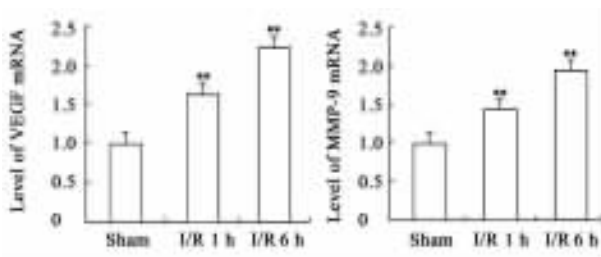


图 3 VEGF 和 MMP-9 mRNA 的表达

Fig 3 Expression of VEGF and MMP-9 mRNA

\*  $P<0.01$  vs Sham group

### 3 讨论

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。虽然肝脏外科技术和诊断水平取得很大进展,但长期随访发现多数肝癌根治性切除患者术后仍死于肿瘤复发转移,复发转移已成为影响患者术后疗效和获得长期生存的关键因素之一,成为当前肝癌诊治研究的重点和难点。肝癌切除不彻底,术后残留肿瘤继续生长,是肝癌早期复发转移的最直接原因<sup>[8]</sup>。然而,临床实践发现很多切除彻底的患者术后也会发生复发转移,提示还存在其他因素诱导肿瘤复发。de-Boer等<sup>[1]</sup>研究发现术中阻断肝门导致的缺血再灌注损伤有可能会诱导肝癌的复发转移。然而,Chouker等<sup>[3]</sup>研究却发现肝脏缺血再灌注后氧化应激过程中产生的氧自由基对肿瘤组织可产生明显的损伤,最终导致细胞凋亡,由此认为,肝脏缺血再灌注除具有组织损伤的不利作用外,对肿瘤组织可能还具有杀伤和治疗作用。因此肝脏缺血再灌注对肿瘤组织生长转移的作用值得深入探讨和研究。

肿瘤血管生成是肿瘤生长和转移的形态学基础,它不仅为肿瘤提供充足的营养,而且为转移的肿瘤细胞提供通道,增加肿瘤细胞进入血液循环的几率。VEGF是目前发现的作用最强、特异性最高的血管生成因子,参与了血管新生的每个环节<sup>[9]</sup>。细胞外基质的降解是肝癌复发转移的必要条件,肿瘤细胞从原发肿瘤分离脱落后,必须穿透细胞外基质才能进入脉管系统,目前已发现肝癌细胞产生多种与溶解细胞外基质和基底膜有关的酶,基质金属蛋白酶在其中起着非常重要的作用。Zhang等<sup>[10]</sup>的研究证实MMP-2、MMP-9和基质降解素的活化与肝癌浸润、肝内转移和术后复发有关。钟崇等<sup>[11]</sup>的研究亦表明,肿瘤组织中VEGF及MMP-9表达与肝癌的复发相关,高表达VEGF及MMP-9的肝癌易于复发及转移。

本研究结果表明缺血再灌注损伤后肿瘤组织生长明显增快;且再灌注后肿瘤组织病理学观察发现,缺血再灌注损伤后早期癌旁肝实质中形成的炎症细胞浸润和变性坏死病灶逐渐被肿瘤细胞浸润代替。为进一步探讨其可能的作用机制,本研究应用实时荧光定量PCR技术观察了缺血再灌注后1h和6h癌旁组织转移相关基因VEGF及MMP-9的表达。结果发现,缺血再灌注损伤后,裸鼠肝癌癌旁组织中VEGF和MMP-9 mRNA表达均升高,明显高于假手术组( $P < 0.01$ ),且二者表达具有一定相关性( $r = 0.418, P < 0.01$ )。结果表明肝脏缺血再灌注促进了

癌旁组织中VEGF及MMP-9 mRNA的表达。

本研究结果证实肝门阻断所导致的缺血再灌注损伤加速了肝癌肿瘤细胞的生长,促进了癌旁组织中与转移复发相关基因(VEGF及MMP-9)的表达,可能会引起肿瘤切除术后的复发与转移,为后续研究奠定了基础。

(志谢 本研究得到第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室及综合治疗科殷正丰、施乐华教授的支持和帮助,在此一并表示感谢!)

### [参考文献]

- [1] de-Boer M T, Molenaar I Q, Porte R J. Impact of blood loss on outcome after liver resection[J]. *Dig Surg*, 2007, 24: 259-264.
- [2] Tsuruma T, Sahara H, Takenouchi M, Yagihashi A, Iwayama Y, Shima H, et al. Synthetic sulfonolipids deduced from sulfonolipid diacylglycerols of sea urchin reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Transplant Proc*, 2004, 36: 1965-1969.
- [3] Chouker A, Martignoni A, Schauer R, Dugas M, Rau H G, Jauch K W, et al. Beneficial effects of ischemic preconditioning in patients undergoing hepatectomy: the role of neutrophils[J]. *Arch Surg*, 2005, 140: 129-136.
- [4] 赵佐庆, 陈洪茂. 肝癌组织和正常肝组织缺血再灌注损伤的比较研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14: 497-500.
- [5] Nicoud I B, Jones C M, Pierce J M, Earl T M, Matrisian L M, Chari R S, et al. Warm hepatic ischemia-reperfusion promotes growth of colorectal carcinoma micrometastases in mouse liver via matrix metalloproteinase-9 induction[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 2720-2728.
- [6] Sahin A, Kiratli H, Soylemezoglu F, Tezel G G, Bilgic S, Saracbası O. Expression of vascular endothelial growth factor-A, matrix metalloproteinase-9, and extravascular matrix patterns and their correlations with clinicopathologic parameters in posterior uveal melanomas[J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2007, 51: 325-331.
- [7] van-der-Bilt J D, Kranenburg O, Nijkamp M W, Smakman N, Veenendaal L M, Te-Velde E A, et al. Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model[J]. *Hepatology*, 2005, 42: 165-175.
- [8] McCormack L, Petrowsky H, Clavien P A. Surgical therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 17: 497-503.
- [9] Sun H C, Tang Z Y. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130: 307-319.
- [10] Zhang Q, Chen X, Zhou J, Zhang L, Zhao Q, Chen G, et al. CD147, MMP-2, MMP-9 and MVD-CD34 are significant predictors of recurrence after liver transplantation in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5: 808-814.
- [11] 钟崇, 郭荣平, 石明, 韦玮, 俞武生, 李锦清. VEGF与MMP-9在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. *癌症*, 2006, 25: 599-603.