

乙醇酸注射对大鼠肝脏的坏死作用研究

李莹¹, 杨秋霞¹, 孙靖¹, 郑唯强², 陈建明¹ (1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433)

摘要 目的: 观察乙醇酸注射对大鼠肝脏的局部坏死作用, 并与无水酒精注射所导致的鼠肝坏死程度作比较。方法: 对鼠肝局部注射一系列浓度的乙醇酸和无水酒精后, 测量大鼠肝脏坏死的平均直径并对其进行病理组织学考察。结果: 乙醇酸可引起大鼠肝脏局部坏死, 且与周围分界清晰。由浓度为 5%、10%、15%、20%、30%、40% 和 50% 的乙醇酸所导致的鼠肝坏死区域最大横截面的平均直径均比由无水酒精导致的大 ($P < 0.05$), 且光镜也进一步证实了乙醇酸对鼠肝所产生的更完全的坏死作用。结论: 乙醇酸可引起大鼠肝局部较完全坏死, 有望作为一种新的化学灭活剂, 代替无水酒精局部注射治疗肝癌。

关键词 乙醇酸; 无水酒精; 肝坏死; 大鼠

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)05-0337-04

Studies on glycolic acid injection resulting in local necrosis of rat livers

LI Ying¹, YANG Qiuxia¹, SUN Jing¹, ZHENG Weiqiang², CHEN Jianming¹ (1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT **Objective** To observe local necrosis of rat livers resulted from glycolic acid injection and compare necrosis effects resulted from glycolic acid injection and ethanol injection. **Methods** After injections of a series of concentrations of glycolic acid and ethanol into rat livers, the mean diameters and the pathologic histology examinations of coagulation necrosis in rat livers were detected. **Results** Necrosis occurred around the injection site of glycolic acid. The mean diameter of the necrotic area caused by 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40% and 50% glycolic acid was significantly larger than that caused by ethanol ($P < 0.05$), and pathohistology confirmed that the necrosis was more serious in the former group. **Conclusion** Glycolic acid could cause local necrosis of liver and might be used in clinical practices in the future as a substitute of ethanol for the treatment of liver cancer.

KEY WORDS glycolic acid; ethanol; hepatic local necrosis; rats

原发性肝癌是一种预后极差的恶性肿瘤, 外科手术治疗仍然是目前公认的首选治疗方法。但受肿瘤大小、数量、部位、肝硬化程度等多种因素限制, 只有不到 30% 的患者最终能获得手术治疗的机会^[1]。同时受术中输血、残留病灶等影响, 手术治疗的远期疗效较差^[2-3], 术后 5 年内复发率可高达 85% ~ 95%^[4]。近十余年来, 超声介入治疗肝癌如注射无水酒精等化学药物治疗和射频、微波等物理疗法等成为肝癌非手术治疗的重要手段, 尤其成为复发性肝癌的重要治疗手段。其中超声介入注射无水酒精治疗肝癌由于操作技术简便、疗效可靠、毒副作用小等优点已在临床上广泛应用, 特别对复发性肝癌的治疗更显示出其优越性^[5], 其基本原理是在影像学手段的引导下或直视下, 经皮肤或切口将穿刺针插

入瘤体内, 将无水酒精注入癌灶, 通过使细胞脱水及蛋白质变性的作用而灭活肿瘤细胞^[6]。Yamanoto^[7]等认为对于直径 < 3 cm 的肝癌无水酒精注射可取得与手术相同的治疗效果。

但是无水酒精注射治疗肝癌仍然存在不足之处: 由于肝癌癌结节内存在纤维分隔, 而酒精的渗透力较差, 造成酒精在瘤体内弥散不均匀, 导致治疗效果降低, 只有通过增加注射次数及用量才能达到更好的治疗效果。而由于无水酒精的刺激性较大, 用量过大或反复使用又会加重患者的肝脏损害, 并且无水酒精注射对于较大瘤体的灭活仍有一定的困难。因此, 寻找一种能在较短的治疗周期对肿瘤达到更强的灭活作用的药物就显得尤为重要。本研究选用了乙醇酸, 它是一种 pH 值较低的酸性有机化合物, 具有很强的溶解脂质和胶原的能力, 在组织中具有较强的扩散能力和毁坏细胞作用, 肝功能损害小, 目前已广泛作为护肤品用于深度清洁皮肤、消除

作者简介: 李莹 ((1983-), 女, 硕士研究生. E-mail: yinger525@126.com.

通讯作者: 陈建明. Tel (021) 81871291 E-mail: yjcjm@163.com.

粉刺皱纹及作为生物降解材料用于制备体内埋植型缓释药物系统、生物吸收外科缝合线、人造骨骼和器官材料等。考虑到乙醇酸的以上特性,我们将其作为一种高效的化学灭活剂引入到肝癌的介入治疗中,通过对大鼠肝脏坏死作用的研究,观察并比较乙醇酸与无水酒精的药效。

1 材料与方 法

1.1 材料 无水酒精(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);乙醇酸(上海邦成化工有限公司,分析纯),分别配制浓度为 5%、10%、15%、20%、30%、40%和 50% (分别为 5 g、10 g、15 g、20 g和 30 g乙醇酸溶于 100 mL生理盐水)的乙醇酸各 10 mL,灭菌备用;水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,分析纯),配制成 10% 溶液;雄性 SD大鼠 47只,体重 200~ 220 g 于第二军医大学药学院实验动物中心喂养,在 (25 ± 2) °C条件下,常规进食及饮水。

1.2.1 实验分组及方法 雄性 SD大鼠 7只以

10%水合氯醛麻醉后开腹,用 4号针头注射。以 20%乙醇酸每只 50 μL肝内注射,然后关腹。关腹后 1 h、1、2、3、5、7、8 d分别处死 1只大鼠,取出肝脏,福尔马林固定后做 HE染色,分析病理。另有雄性 SD大鼠 40只,分为 8组: 5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%乙醇酸组及无水酒精组,每组 5只。以水合氯醛麻醉后开腹,注射不同浓度乙醇酸及无水酒精,每只 50 μL入肝,然后关腹。待 3 d后将鼠处死,取出肝脏,做肝脏坏死的最大横截面,测量其长径和短径并取两者的均值作为记录值,然后将肝脏用福尔马林固定后做 HE染色分析病理^[8,9]。

1.2.2 统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,均数比较用 *t*检验, *P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

注射 50 μL乙醇酸和无水酒精后大鼠肝脏出现凝固性坏死,坏死区域的最大横截面呈椭圆形(图 1)。

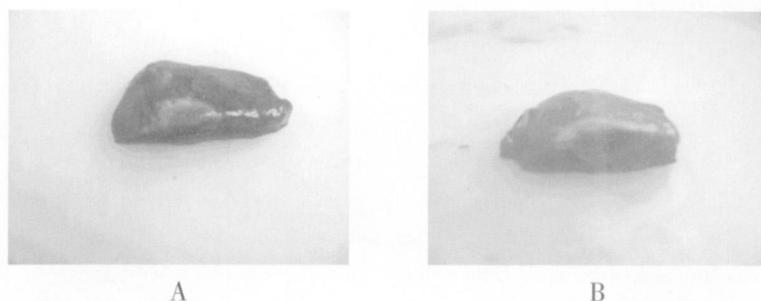


图 1 注射 50 μL 无水酒精(A)和 20%乙醇酸(B)3 d后大鼠肝脏的坏死情况

观察 20%乙醇酸注射后不同时间肝组织学改变特点。第 1天肉眼见局部充血坏死,有少量出血,边界不清楚,镜下见肝细胞大片状出血,出血区周围肝细胞变性、坏死,肝细胞核固缩、溶解、碎裂(图 2A)。第 2天,以注射点为中心发生凝固性肝细胞坏死,坏死灶内可见许多碎核及炎细胞渗出、浸润(图 2B)。第 3天,病变区颜色变淡,边界

较清,镜下见大片状肝细胞坏死,坏死周边有肉芽组织形成(图 2C)。第 5天,坏死周围组织反应更为明显,坏死与正常肝细胞之间形成纤细的纤维条索带(图 2D)。至第 7、8天,病灶呈土黄色坏死灶,边界清,于大片坏死肝细胞边缘出现大量增生的纤维母细胞、毛细血管,内有较多的炎细胞浸润及肉芽组织形成。

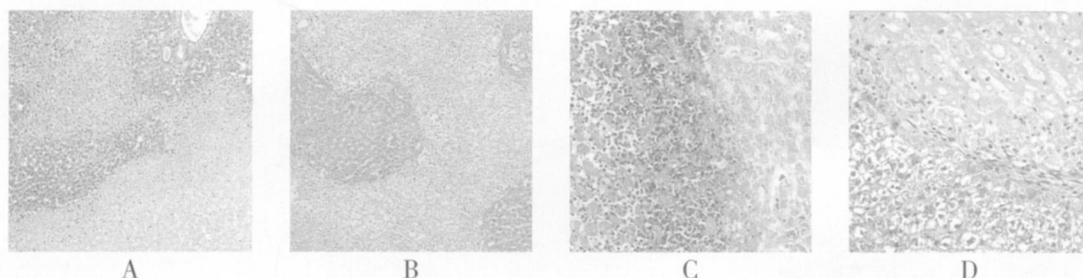


图 2 注射 20%乙醇酸后大鼠肝脏的病理变化

A-注射后第 1 天肝细胞变性、坏死; B-注射后第 2 天肝细胞坏死严重,炎细胞渗出、浸润;
C-注射后第 3 天坏死周边有肉芽组织形成; D-注射后第 5 天坏死与正常肝细胞之间形成纤细的纤维条索带

大鼠肝脏坏死区域最大横截面的平均直径 [(长径 + 短径) / 2] 见表 1。随着乙醇酸浓度的增加肝脏坏死面积逐渐增大, 其坏死平均直径随浓度变

化曲线见图 3。由 5%、10%、15%、20%、30%、40% 和 50% 乙醇酸导致的肝脏坏死区域最大横截面的平均直径均比由无水酒精导致的大 ($P < 0.05$)。

表 1 注射 50 μ L 乙醇酸或无水酒精 3 d 后大鼠肝脏坏死的平均直径 ($\bar{x} \pm SD$, cm)

直径	乙醇酸浓度						无水酒精	
	5%	10%	15%	20%	30%	40%		50%
	0.50 \pm 0.25	0.61 \pm 0.29	0.80 \pm 0.24	1.03 \pm 0.18	1.30 \pm 0.27	1.43 \pm 0.29	1.58 \pm 0.21	0.41 \pm 0.32

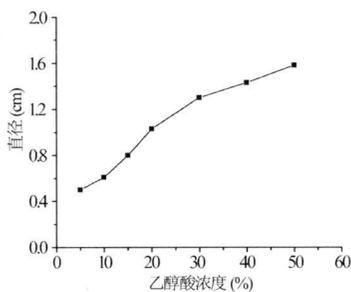


图 3 肝坏死平均直径随乙醇酸浓度变化曲线

观察无水酒精及不同浓度的乙醇酸注射 3 d 后肝组织学改变特点。无水酒精注射后, 肝细胞凝固性坏死, 肝窦扩张、充血, 中性粒细胞渗出, 坏死肝细胞的核仍可淡染着色, 坏死周围细胞渗出和组织细胞反应。5%、10%、15%、20%、30%、40% 和 50% 乙醇酸注射后, 均引起以注射点为中心的肝细胞凝固性坏死。肝组织结构可辨认, 但坏死程度有所不同。注射 5% 和 10% 者肝组织学的改变基本同无水酒精, 部分肝细胞核尚可淡染着色, 坏死灶内碎核较多, 窦内有中性粒细胞渗出, 坏死周边有轻微的肉芽样反应。注射 15% ~ 50% 者, 肝细胞坏死较彻底, 核不着色, 坏死灶内碎核少, 随乙醇酸浓度的增加肝细胞坏死更彻底、坏死周围组织细胞反应程度更大。

3 讨论

本研究首次通过对大鼠肝脏的坏死作用研究证实了乙醇酸确实有效, 且其疗效优于无水酒精。从实验中可以观察到乙醇酸注射后, 局部肝细胞产生坏死, 病变周围肉芽组织包绕出现早且厚, 并逐渐纤维化, 使坏死灶局限; 注射局部坏死完全, 与周围分界非常清晰, 且肝组织对坏死灶修复较快, 符合临床要求。5%、10%、15%、20%、30%、40% 和 50% 7 个浓度组的乙醇酸引起的坏死区平均直径均明显大于无水酒精组 ($P < 0.05$), 且随乙醇酸浓度的增加形成的坏死区范围增大, 表明乙醇酸导致的肝局部坏死作用增强。

无水酒精注射治疗肝癌虽因疗效肯定、方法简便而得到临床广泛应用, 但仍因酒精渗透能力有限, 从而产生疗程长、需要较大剂量和多次注射才能使肿瘤完全坏死以及对较大的非均质性肝癌可能存在残余病灶等局限性。我们的研究已表明了乙醇酸对大鼠肝脏的坏死作用明显优于无水酒精, 因此若将其用于肝癌局部消融, 将可使肿瘤大块坏死, 从而消除酒精局部注射治疗小肝癌时瘤周细胞的继续生长, 而达到治愈肿瘤的目的或使肿瘤得到有效的控制; 同时注射次数与用量也将较无水酒精少, 从而提高肿瘤缩小率、减轻患者疼痛, 并将减少并发症及降低复发率。此外, 乙醇酸适应证也因此有望被拓展, 在治疗直径 < 3 cm 的肝癌基础上, 将可能应用于直径为 3 ~ 5 cm 甚至 > 5 cm 的肝癌的治疗。因此, 乙醇酸局部注射将可能对中晚期大肝癌患者同样是一种延长生命的有效方法, 并成为配合大肝癌介入治疗后的综合性治疗的重要部分。

在以上实验中未出现大鼠死亡情况, 初步证实乙醇酸在实验动物中的安全性。此外, 乙醇酸目前在日用化工方面是疗效较好的去除死皮和汗毛药剂, 可合成抗皮肤衰老、美白化妆品原料果酸; 在医药工业方面由乙醇酸制备的高分子材料 PLGA 具有优异的可生物降解性与生物相容性, 可以在体内通过降解, 代谢成二氧化碳和水排出体外, 因此广泛用于制备体内埋植型缓释药物系统、埋植型修复器械、生物吸收外科缝合线、人造骨骼和器官材料等, 这些应用都表明了乙醇酸对人体的安全性。

综上所述, 乙醇酸可引起大鼠肝脏局部较完全坏死, 有望作为一种新的化学灭活剂, 代替无水酒精局部注射治疗肝癌。其对人体的确切效果及安全性还有待于临床的进一步研究与探讨。

参考文献:

[1] 吴孟超, 吴东. 原发性肝癌综合治疗的现状与展望 [J]. 癌症进展, 2005, 3(5): 410
 [2] Trahaio JG, Kaya IS, Dagher J *et al*. Resection of hepatocellular carcinoma: the effect of surgical margin and blood transfusion on

以批号为 080512 的 Medibx 氧化电位水为消毒剂对物体表面消毒现场试验结果见表 3。

表 3 Medibx 氧化电位水对物体表面消毒结果 (cfu/cm²)

存放日期 (d)	样本数	对照组菌落数	试验组菌落数	灭菌率 (%)
0	30	46	3	93.91
30	30	138	10	92.46
60	30	195	11	94.46
90	30	105	7	93.51

注: 各次试验阴性对照组均为无菌生长

从表 3 中可以看出, 在试验条件下, Medilox 氧化电位水存放不同时间, 作用 15 min 对物体表面自然菌的杀灭率各次试验均达 90% 以上。

4 结论与讨论

氧化电位水 (EOW) 制备是通过将一定浓度的 NaCl 溶液在特制的电解槽中进行电解, 从阳极一侧出来的水叫酸性氧化电位水。

EOW 的杀菌作用主要取决于氧化还原电位的高低和有效氯的含量^[11], 而 pH 值即能影响氯在溶液中的形态, 又对皮肤刺激性和金属腐蚀性具有较大影响。所以氧化还原电位、有效氯含量、pH 值是评价氧化电位水最常用的 3 个性能指标。我们参考厂家提供的试验资料, 确定以氧化还原电位、有效氯含量、pH 值作为 Medilox 氧化电位水的评价指标。

检测结果表明, 3 批超氧化水于室温条件下, 90 d 内有效氯含量、pH 值、氧化还原电位均符合质量标准的要求, 对手及物体表面自然菌的杀灭率均在 90% 以上, 表明在 90 d 的观察期内杀菌性能稳定。

同时从理化指标的检测可以看出, Medilox 氧化电位水在存放过程中, 有效氯含量和 pH 值下降较明显, 这主要是 EOW 中的次氯酸不稳定, 易分解, 放出氧气和氯气, 从而降低溶液中的氯含量并引起 pH 值改变。提示我们在生产及存放过程中要控制好条件和时间。

参考文献:

- [1] Chizuko MT, Kouichi S, Shinichi MM. *et al* Disinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chlorine at low concentration [J]. *Virological Methods*, 2000, 85: 163
- [2] Henry BM, Tatiana C, Kristin SC. *et al* New UV irradiation and direct electrolysis promising methods for water disinfection [J]. *Chem Eng*, 2002, 85: 111
- [3] Joyce E, Mason TJ, Phyllis SS. *et al* The development and evaluation of electrolysis in conjunction power ultrasound for disinfection of bacterial suspensions [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2003, 10: 231
- [4] 孙薇, 任清明, 李东力. 酸性氧化电位水杀菌机制及应用研究进展 [J]. *中国消毒学杂志*, 2004, 21 (4): 371
- [5] 刘玉杰, 陈雪梅, 麦海珠, 等. 酶洁液和氧化电位水在胃镜全浸泡式消毒中的效果观察 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2005, 10 (2): 70
- [6] 鄂志强, 王旻, 王洪, 等. 酸性氧化电位水应用于乳品消毒工艺的探讨 [J]. *中国乳品工业*, 2005, 33 (8): 48
- [7] 陈春田, 李东力, 王亚玉, 等. 两种消毒剂对食堂餐厨具消毒效果观察 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2005, 23 (6): 423
- [8] 任占冬, 朱玉婵, 张奇, 等. 氧化电位水制备工艺条件的考察 [J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27 (9): 1241
- [9] 曾新平, 林黎, 唐文伟, 等. 酸性氧化电位水制备工艺的优化 [J]. *中国消毒学杂志*, 2008, 25 (2): 131
- [10] 刘慧. 酸性氧化电位水的杀菌效果及医用价值 [J]. *医学综述*, 2004, 10 (11): 699

收稿日期: 2008-12-25

(上接第 339 页)

- long-term survival Analysis of 209 consecutive patients [J]. *Hepatology*, 2007, 54 (76): 1200
- [3] Shah SA, Cleary SP, Wei AC, *et al* Recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: Risk factors, treatment and outcome [J]. *Surgery*, 2007, 141 (3): 330
 - [4] Poon RT, Fan ST, Ng J, *et al* Difference risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2000, 89 (3): 500
 - [5] 易玉海. 经皮肝癌内无水酒精注射 [J]. *山东医药*, 2006, 46 (17): 86
 - [6] 周信达, 刘银坤. 原发性肝癌复发转移防治的临床与基础研究 [J]. *医学研究通讯*, 2001, 30 (3): 11

- [7] Yamamoto J, Okada S, Shinada K, *et al* Treatment strategy for small hepatocellular carcinoma: comparison of long-term results after percutaneous ethanol injection therapy and surgical resection [J]. *Hepatology*, 2001, 34 (4): 707
- [8] Ohnishi K, Ohyan A, Ito S, *et al* Small hepatocellular carcinoma treatment with US-guided intratumoral injection of acetic acid [J]. *Radiology*, 1994, 193 (3): 747
- [9] 邹晓平, 牛燕陵, 尹宁, 等. 肝脏注射醋酸引起局部坏死的实验研究 [J]. *上海生物医学工程*, 1999, 20 (2): 46

收稿日期: 2009-03-11