

## ·实验研究 Experimental research·

## 经皮注射医用臭氧治疗兔 VX2 移植瘤的实验研究

韩世龙, 朱晓黎, 张 猛, 郭永团, 徐云华

**【摘要】 目的** 观察臭氧局部注射治疗实体肿瘤的安全性、对肝肾功能的影响及所致的组织病理学改变。**方法** 建立兔 VX2 移植瘤模型 24 只,分为三组,A、B 组均为 9 只,C 组 6 只(假手术组)。向 A、B 组瘤内分别注入 40  $\mu\text{g/ml}$  和 70  $\mu\text{g/ml}$  浓度臭氧,并于术前 1 d、术后 1、3 d 抽静脉血。术后 3 d 处死动物,取病理标本。观察术后动物生命体征、并发症及大体标本的组织学变化。**结果** 实验动物术后 24 h 内均出现活动减少、纳差,对刺激反应差,精神萎靡,24 h 后恢复正常。A、B 组各有 1 只荷瘤兔于术中或术后 1 h 内死亡。术前 1 d、术后 1、3 d 各组血清丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶及肌酐比较无明显差异。肉眼及光镜下见 A、B 组坏死区大体标本无明显差异。C 组镜下可见部分肿瘤细胞突破肌层向深处生长,肿瘤细胞排列紊乱,大量癌巢形成,细胞核大深染,核分裂,异性核。**结论** VX2 肿瘤内注入浓度为 40  $\mu\text{g/ml}$  和 70  $\mu\text{g/ml}$  的医用臭氧安全、有效。

**【关键词】** 实体肿瘤; 医用臭氧; 安全性; 坏死

中图分类号:R73.3 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2013)-03-0223-05

**Percutaneous medical ozone injection for transplanted VX2 tumors: an experimental study in rabbits**

HAN Shi-long, ZHU Xiao-li, ZHANG Meng, GUO Yong-tuan, XU Yun-hua. Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu Province 216006, China

Corresponding author: ZHU Xiao-li, E-mail: zhuxiaoli90@163.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the safety and effectiveness of percutaneous medical ozone injection in treating solid transplanted VX2 tumors in rabbits, and to discuss the histopathological changes cause by ozone injection. **Methods** Transplanted VX2 tumor model was established in 24 rabbits. The rabbits were randomly divided into three groups. Rabbits in group A ( $n = 9$ ) received medical ozone (40  $\mu\text{g/ml}$ ) injection of the tumor. Rabbits in group B ( $n = 9$ ) received medical ozone (70  $\mu\text{g/ml}$ ) injection of the tumor. Rabbits in group C ( $n = 6$ , used as sham group) received no treatment. The serum ALT, AST and Cr levels were determined at one day before and one, three days after the treatment. All the animals were sacrificed at three days after the treatment. The specimens were collected and sent for pathological examination. After the procedure, careful observation of animal's vital signs, complications was executed, and the pathological findings were recorded. **Results** After the treatment reduced activity, anorexia, slow in reaction and listlessness were seen in all animals within 24 hours. One rabbit in group A and one rabbit in group B died during the procedure or within one hour after the procedure. The serum ALT, AST and Cr levels determined at one day before and one, three days after the treatment showed no significant difference among the three groups ( $P > 0.05$ ). Macroscopically and microscopically, the difference in the manifestations of necrosis area was not significant between group A and group B. In group C, microscopic examination revealed that some tumor cells broke through the muscle layer and invaded into the deeper tissue, the tumor cells were arranged in disorder with lots of cancer nests, and the nuclei became larger and hyperchromatic with fragmentation. **Conclusion** For the treatment of transplanted VX2 tumor in rabbits, percutaneous injection of medical ozone with the concentration of 40  $\mu\text{g/ml}$  or 70  $\mu\text{g/ml}$  is safe and effective. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 223-227)

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2013.03.012

作者单位: 216006 苏州大学附属第一医院介入科

通信作者: 朱晓黎 E-mail: zhuxiaoli90@163.com

**【Key words】** solid tumor; medical ozone;

safety; necrosis

臭氧是一种强氧化剂, 常温常态下半衰期约 150 min, 具有免疫激发、消炎、止痛及溶解髓核内蛋白多糖的作用<sup>[1]</sup>。近年来, 临床上应用臭氧经皮注射治疗腰椎间盘突出症, 自体血臭氧回输治疗缺血性脑卒中, 局部吹注臭氧治疗难愈性溃疡均取得了一定进展<sup>[2-3]</sup>。1980 年 Sweet 等<sup>[4]</sup>曾报道体外实验表明, 臭氧浓度在  $0.3 \times 10^{-6} \sim 0.5 \times 10^{-6}$  时可抑制 40% ~ 60% 的肿瘤细胞,  $0.8 \times 10^{-6}$  时可抑制 90% 的肿瘤细胞, 但臭氧抑制及杀灭肿瘤的作用尚未为人们所重视, 本实验旨在探索臭氧在肿瘤治疗中的新途径及其安全性和有效性, 为临床臭氧治疗实体肿瘤的应用提供实验数据支持及临床指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物建模及分组

取普通级纯种成年雄性新西兰大白兔 24 只, 兔龄 4 个月左右, 体重 2.2 ~ 2.5 kg。

1.1.1 动物建模 选择 VX2 荷瘤兔, 无菌条件下切取瘤体, 取靠近肿瘤边缘的灰白色鱼肉样实性瘤组织, 无菌生理盐水中用眼科剪剪成大小约  $1.0 \text{ mm}^3$  的瘤块, 滴入庆大霉素注射液 1 ml 抑菌备用, 在实验兔的两侧臀部近大腿根处肌肉丰厚处接种 VX2 瘤株, 2 周后 B 超证实肿瘤直径达 1.6 ~ 3.4 cm, 平均  $(2.3 \pm 0.85) \text{ cm}$  时, 即为瘤兔模型。

1.1.2 动物分组 24 只 VX2 瘤兔建模成功后, 分为三组, A、B 组各 9 只, C 组 6 只。A 组注射医用臭氧的浓度为 40  $\mu\text{g/ml}$ , B 组为 70  $\mu\text{g/ml}$ , C 组为假手术组, 即以同样方法穿刺到位后, 不注入任何气体或液体。

### 1.2 实验过程

实验动物全麻后, B 超实时监测下刺入 5 ml 注射器针头, 确定针尖避开周围血管置入肿瘤中心部分, 分别制备 40  $\mu\text{g/ml}$  和 70  $\mu\text{g/ml}$  臭氧, 抽吸 2

ml, 监测下回抽证实未在血管腔内, 注入肿瘤组织, 注射过程中, 同样注意观察臭氧有无进入血管, B 超可见肿瘤局部高亮回声(图 1), 于荷瘤兔肿瘤生长良好的一侧, 单点注射, 一次性完成。B 超再次观察肿瘤组织大小及毁损区大小。术后常规饲养。

### 1.3 观察指标及方法

术后每天观察瘤兔的一般生活情况, 于术前 1 d、术后 1、3 d 分别从兔耳缘抽取静脉血, 检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)及肌酐(Cr)水平。各组实验动物于术后 3 d 处死, 取瘤体标本进行 HE 染色。切取病灶内消融灶中心组织及边缘组织为检测标本, 切除的标本立即在 4% 甲醛液中固定, 行 HE 染色。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 统计前经方差齐性检验, 各组间比较采用方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 检验, 组内比较采用 *t* 检验, 计数资料采用卡方检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 治疗后动物一般情况

三组动物术后 24 h 内均出现活动减少、纳差, 对刺激反应差, 精神萎靡, 24 h 后基本恢复正常, 以 A、B 组实验动物表现明显。A、B 组各有 1 只兔于术中或术后 1 h 内死亡, 2 只兔均为术中注射臭氧后出现呼吸急促、抽泣样呼吸、躁动, 唇绀, 于胸外按压胸廓行心肺复苏后抢救无效死亡, 考虑为实验初期操作经验缺乏, 臭氧进入血管, 气体栓塞所致, 死亡兔均及时补充。B 组 1 只兔术后出现短暂性跛行后自愈。余兔均未出现严重并发症。

### 2.2 干预前后血清肝、肾功能变化

干预前 1 d 各组血清 ALT、AST 和 Cr 水平无明显

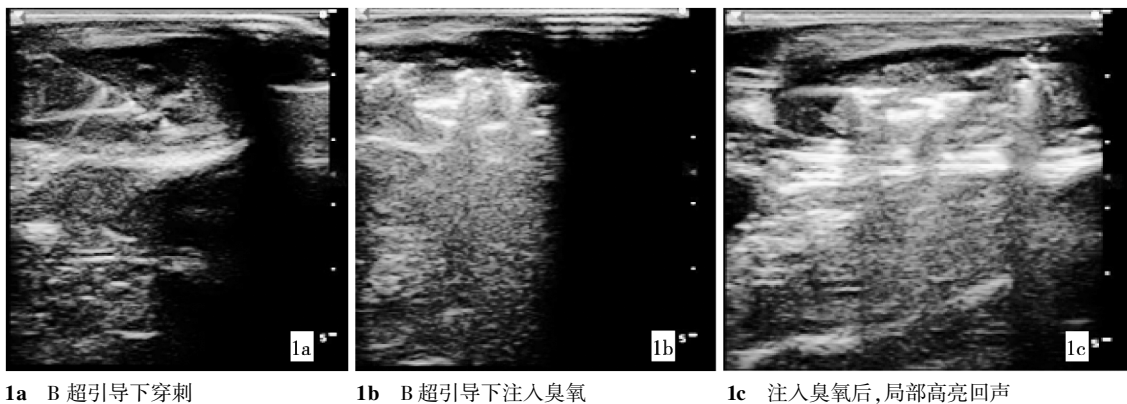


图 1 臭氧注入肿瘤组织过程

显差异。术后 1 d 各组血清 ALT、AST 及 Cr 水平达到峰值,与术前 1 d 相比无显著差异;术后 3 d 血清 ALT、AST、Cr 水平开始下降并趋于术前水平,各组间两两比较亦无显著差异(表 1~3,图 2)。

表 1 各组干预前后丙氨酸转氨酶水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	丙氨酸转氨酶( $\mu\text{mol/L}$ )		
	术前 1 d	术后 1 d	术后 3 d
A 组	52.89 $\pm$ 22	72.78 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	54.78 $\pm$ 20 <sup>a</sup>
B 组	56.67 $\pm$ 31	69.56 $\pm$ 28 <sup>a</sup>	57.22 $\pm$ 29 <sup>a</sup>
C 组	59.17 $\pm$ 24	67.00 $\pm$ 29 <sup>a</sup>	62.67 $\pm$ 21 <sup>a</sup>
F 值	0.054	0.042	0.098
P 值	0.449	0.460	0.411

<sup>a</sup> 与术前比较  $P < 0.05$

表 2 各组干预后天冬氨酸转氨酶水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	天冬氨酸转氨酶( $\mu\text{mol/L}$ )		
	术前 1 d	术后 1 d	术后 3 d
A 组	58.33 $\pm$ 19	68.33 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	43.33 $\pm$ 22 <sup>a</sup>
B 组	47.44 $\pm$ 14	88.77 $\pm$ 39 <sup>a</sup>	40.22 $\pm$ 17 <sup>a</sup>
C 组	50.83 $\pm$ 20	62.83 $\pm$ 32 <sup>a</sup>	47.67 $\pm$ 14 <sup>ab</sup>
F 值	0.453	0.823	0.146
P 值	0.208	0.108	0.375

<sup>a</sup> 与术前比较  $P < 0.05$

表 3 各组干预前后血清肌酐水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	血清肌酐( $\mu\text{mol/L}$ )		
	术前 1 d	术后 1 d	术后 3 d
A 组	52.60 $\pm$ 29	78.56 $\pm$ 32 <sup>a</sup>	56.22 $\pm$ 26 <sup>a</sup>
B 组	50.22 $\pm$ 10	78.22 $\pm$ 37 <sup>a</sup>	57.89 $\pm$ 18 <sup>a</sup>
C 组	50.00 $\pm$ 10	51.33 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	50.00 $\pm$ 13 <sup>a</sup>
F 值	0.134	0.873	0.233
P 值	0.383	0.100	0.311

<sup>a</sup> 与术前比较  $P < 0.05$

### 2.3 大体标本观察

肉眼可见臭氧治疗两组肿瘤病灶外有完整包膜存在,沿包膜肌纤维走行逐步解剖肿瘤组织,可见肿瘤局部充血肿胀,肿瘤内消融区周边为乳白色乳糜样坏死组织,中间区液化坏死组织,A、B 组间坏死区大体标本无明显差异。C 组接种肿瘤处可见肿瘤呈近似圆柱形,灰白色鱼肉样实性肿瘤组织。

### 2.4 病理学观察

光镜下观察 A、B 组,消融导致的细胞坏死形态基本相同,肿瘤细胞与周围正常组织细胞界限清晰,可见肿瘤细胞侵犯肌层,肿瘤细胞可见大片凝固坏死,表现为组织、细胞结构破坏,部分形态尚存,见细胞破裂、溶解、坏死细胞碎片。C 组镜下仅见少量坏死肿瘤细胞,肿瘤与附近组织界限清晰,部分肿瘤细胞突破肌层向深处生长,肿瘤细胞排列紊乱,呈巢状或弥漫性分布,可见大量癌巢形成,细胞核深染,可见核分裂,异性核(图 3)。

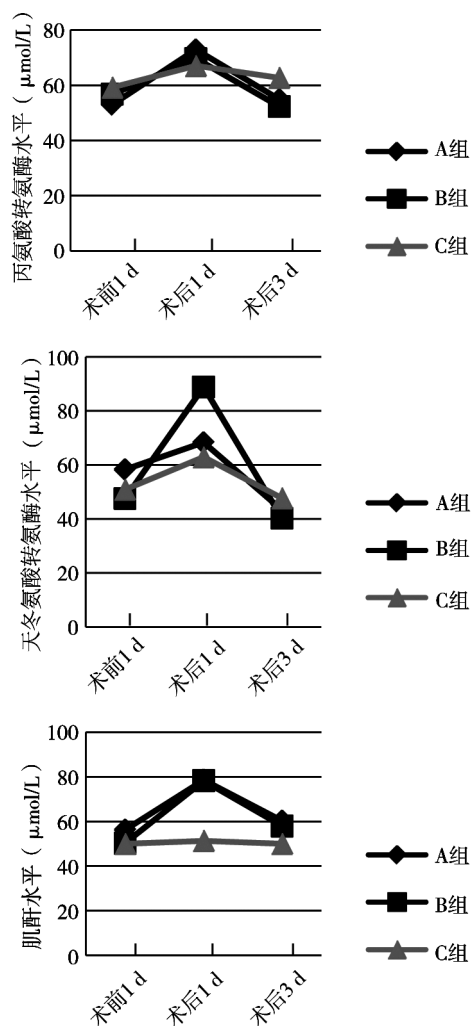
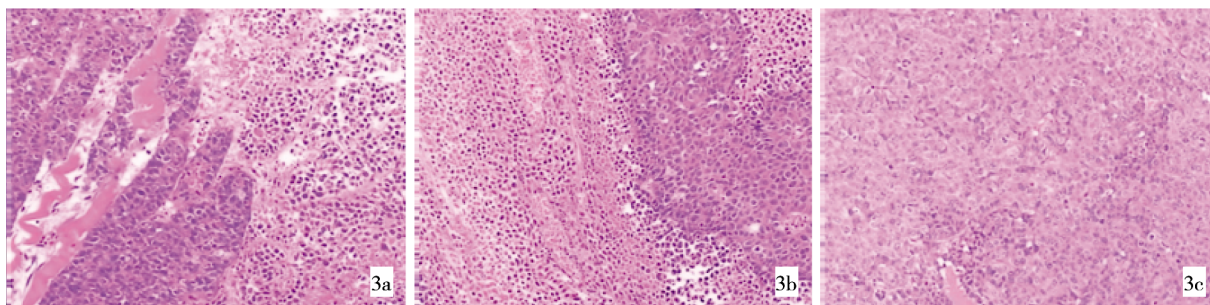


图 2 干预前后肝动脉指标变化

## 3 讨论

### 3.1 医用臭氧治疗恶性肿瘤的可行性

臭氧作为一种强氧化剂,近年来国内医生在临床上主要用于治疗腰椎间盘突出症、缺血性脑卒中及难愈性溃疡,而对其在抑制肿瘤生长和治疗肿瘤方面的作用少有报道。1995 年美国国立卫生研究院将氧化剂(臭氧、过氧化氢)作为五类抗肿瘤治疗方法之一,其中包括螯合作用、代谢治疗、细胞治疗和抗氧化剂治疗。有报道臭氧在晚期头颈部肿瘤患者作为辅助治疗与静脉化疗联合应用,结果表明臭氧治疗可能有助于增加静脉化疗的效果。此外,在另一组晚期头颈部肿瘤采用化疗及放射治疗联合自血回输臭氧疗法,结果表明臭氧治疗可能既增加静脉化疗效果,又增加放射治疗效果<sup>[5-6]</sup>。2008 年有报道采用经皮腹膜内注射臭氧治疗新西兰大白兔耳 VX2 移植瘤,14 只荷瘤兔中 6 只肿瘤消失,取得了满意的治疗效果。国内有报道经皮瘤内注射医用臭



**3a** A 组臭氧消融区肿瘤细胞大片凝固坏死 (HE, × 100) **3b** B 组臭氧消融区肿瘤细胞大片凝固坏死 (HE, × 100) **3c** C 组仅见少量坏死肿瘤细胞, 可见大量癌巢形成, 细胞核深染, 可见核分裂, 异性核 (HE, × 100)

**图 3** 三组肿瘤组织病理染色所见

氧治疗 VX2 移植瘤的动物实验, 显示该治疗方法可有效控制肿瘤生长, 减少肿瘤转移。

本组实验采用经皮穿刺瘤体 B 超引导下直接注射臭氧。在预实验中使用 CT 为引导方法, 发现缺乏实时性, 不能降低治疗过程中造成气体栓塞的风险, 实验中改用 B 超为引导工具, 对肿瘤组织进行实时定位、测量肿瘤组织大小等操作。预实验过程中先后注射了 3 ~ 5 ml 臭氧观察, 其死亡率均较高, 反复预实验结果显示 2 ml 是安全剂量。实验过程中死亡的 2 只荷瘤兔出现气体栓塞等表现, 经胸外按压等抢救后未成功, 考虑为实验早期操作者应用 B 超熟练度欠佳及穿刺方法失范有关。

### 3.2 医用臭氧治疗的毒性作用及对肝肾功能影响

相关研究证实臭氧毒性主要表现在以下方面:

① 有证据表明臭氧对气管、肺脏非常有害, 且随着空气中臭氧浓度增加, 其毒性作用相应增加<sup>[3,7]</sup>。② 臭氧作为强氧化剂与 DNA、RNA 等生物大分子反应, 可能导致其结构受损, 存在潜在的遗传毒性。但这一结论尚存在争议<sup>[8]</sup>。③ 臭氧鞘内注射可导致脑脊液中具有细胞毒性作用的丙二醛水平升高, 这表明臭氧有较为确切的神经毒性<sup>[9-10]</sup>。目前尚无其他研究证实臭氧对肝肾功能是否有影响。本实验检测了两组不同浓度臭氧局部注入肿瘤前后肝肾功能的变化, 结果表明低剂量瘤内注射臭氧后, 血清 ALT、AST 及 Cr 术后 1 d 有轻度升高, 3 d 后恢复基线水平, 血清 ALT、AST 及 Cr 升高后对肝肾功能的影响无统计学意义。这一结果证实, 局部实体内注入医用臭氧后, 不会对全身肝肾功能造成损伤, 同时实验过程中也未发现其他器官功能的显著衰退。

### 3.3 各组术后大体标本和病理分析

本实验中 A、B 两组肿瘤内消融区周边为乳白色乳糜样坏死组织, 中间有液化坏死组织, 病理标本可见细胞溶解、破裂等细胞坏死表现, 两组无明

显差异, 证实臭氧浓度在 40 ~ 70  $\mu\text{g/ml}$ , 其组织破坏、穿透力、消融能力无明显差异。其可能的机制为: 臭氧是一种强氧化剂, 极不稳定, 进入组织后能与水分子结合生成过氧化氢、过氧化自由基和羟自由基, 其反应活性极高, 能攻击细胞膜、线粒体膜同时攻击 DNA 造成多种形式的损伤, 使生物膜破裂导致细胞核破裂、溶解, 最终导致细胞坏死<sup>[11]</sup>。同时自由基与生物膜内的不饱和脂肪酸反应, 造成脂质过氧化增强, 引起自由基连锁反应, 造成附加损伤<sup>[12]</sup>。

本实验结果表明, 医用臭氧经皮治疗实体肿瘤在严格规范的操作下是安全的, 且对肝肾功能影响较小, 可造成肿瘤组织坏死。本实验为臭氧在经皮治疗肿瘤方面的初步实验, 未能观察干预治疗后瘤兔的生存期, 由于条件限制未能观察单次治疗后肿瘤组织的生长、转移情况及毁损范围, 其对肿瘤的消融作用机制有待进一步研究。臭氧治疗具有价廉、创伤小、可反复治疗等优点, 有着广阔的应用前景, 值得进一步探索。

### [参考文献]

- [1] Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy: State of the art. Arch Med Res, 2006, 37: 425 - 435.
- [2] Huth KC, Paschos E, Brand K, et al. Effect of ozone on non-cavitated fissure carious lesions in permanent molars: A controlled prospective clinical study [J]. Am J Dent, 2005, 18: 223 - 228.
- [3] Valacchi G, Pagnin E, Corbacho AM, et al. In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin [J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36: 673 - 681.
- [4] Sweet F, Kao MS, Lee SC, et al. Ozone selectively inhibits growth of human Cancer cells [J]. Science, 1980, 209: 931 - 933.
- [5] Zanker KS, Kroczeck R. In vitro synergistic activity of 5-fluorouracil with low-dose ozone against a chemoresistant tumor

- cell line and fresh human tumor cells[J]. Chemotherapy, 1990, 36: 147 - 154.
- [6] Clavo B, Ruiz AM. Adjuvant ozonotherapy in advanced head and neck tumors: A comparative study [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2004, 1: 321 - 325.
- [7] Hollingsworth JW, Kleeberger SR, Foster WM. Ozone and pulmonary innate immunity [J]. Pro Am Thora Soc, 2007, 4: 240 - 246.
- [8] Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. A new mechanism for the toxicity of ozone [J]. Toxicol Lett, 1995, 82 - 83: 287 - 293.
- [9] 陈 辉, 许 华, 熊源长. 医用臭氧研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2009: 258 - 261.
- [10] Connor AJ, Laskin JD, Laskin DL. Ozone-induced lung injury and sterile inflammation: Role of toll-like receptor 4 [J]. Exp Mol Pathol, 2012, 92: 229 - 235.
- [11] Guven A, Gundogdu G, Uysal B, et al. Hyperbaric Oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model[J]. J Pediatr Surg, 2009, 44: 534 - 540.
- [12] Ballinger CA, Cueto R, Squadrito G, et al. Antioxidant - mediated augmentation of ozone-induced membrane oxidation[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38: 515 - 526.
- (收稿日期:2012-10-08)  
(本文编辑:侯虹鲁)