

## • 实验研究 Experimental research •

瘤内注射臭氧致兔 VX<sub>2</sub> 瘤组织  
超微结构改变的研究

魏 强, 方 亮, 杨继金, 霍宁宁, 吕 虎, 熊源长, 江 旭, 李 慧

【摘要】 目的 研究瘤体内注射不同浓度臭氧(O<sub>3</sub>)后兔 VX<sub>2</sub> 瘤组织超微结构的改变,以探讨臭氧用于实验研究/临床应用的安全有效浓度,并根据超微结构改变持续时间,推断重复治疗可能的间隔时间。方法 20 只荷瘤大白兔分为 4 组,对照组 2 只,T20(20%臭氧)、T40(40%臭氧)和 T60 组(60%臭氧)治疗组各 6 只,直视下按瘤体体积 2 倍量不同浓度的 O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> 混合气体用注射器直接注入瘤体内,对照组(仅模拟穿刺)及各治疗组取 2 只兔在实验完成后即刻取材,剩余兔分别于术后第 4、8 天各处死 2 只取材、制片,用透射电镜观察。结果 T20 组注射臭氧后即刻可见肿瘤细胞有轻微的损伤改变,线粒体轻微嵴溶解,少许线粒体呈球状肿胀,内质网扩张,部分核周间隙增宽,细胞间隙正常。T40 组和 T60 组注射臭氧后即刻均可见肿瘤细胞有明显损伤,表现为线粒体明显肿胀,内质网扩张,细胞核肿胀,核周间隙增宽,部分细胞膜崩裂,组织结构崩解,术后第 4 天,可见大片坏死,炎细胞浸润,肿瘤细胞膜不完整,溶酶体线粒体形成(呈新月形黑颗粒)或线粒体溶解,内质网扩张,部分胞质溶解,细胞核不规则,核周间隙扩张,T60 组更明显。血管内皮细胞也有损伤改变。3 组的细胞损伤在术后第 8 天仍可观察到,但呈逐渐修复状态。结论 兔 VX<sub>2</sub> 瘤内注射 20% ~ 60% 臭氧后,都会对肿瘤细胞、瘤内血管内皮细胞造成损伤甚至死亡,20% 的损伤较轻微,40% ~ 60% 的比较明显,但综合安全性及治疗效果,40% 臭氧可能更为明显。虽然有部分修复,但术后第 8 天仍可见较明确的细胞损伤改变,故治疗间隔以 4 ~ 8 d 为宜。

【关键词】 肿瘤; 臭氧; VX<sub>2</sub> 瘤; 超微结构; 治疗

中图分类号:R735 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2013)-10-0830-04

**The changes of ultra-microstructure of transplanted VX-2 tumor caused by the injection of ozone into the tumor: an experimental study in rabbits** WEI Qiang, FANG Liang, YANG Ji-jin, HUO Ning-ning, LV Hu, XIONG Yuan-chang, JIANG Xu, LI Hui. Department of Radiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: YANG Ji-jin, E-mail: jijinyang@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the changes of ultra-microstructure of transplanted VX-2 tumor in rabbits caused by injection of different concentrations of ozone (O<sub>3</sub>) into the tumor in order to determine the proper concentration of O<sub>3</sub> which can be safely and effectively used in experimental study as well as in clinical practice, and based on the duration of the changes of ultra-microstructure to estimate the reasonable interval time for repeated injections of O<sub>3</sub>. **Methods** A total of 20 rabbits bearing VX-2 tumor on hind legs were randomly divided into four groups: control group ( $n = 2$ ), group T20 ( $n = 6$ , using 20% O<sub>3</sub>), group T40 ( $n = 6$ , using 40% O<sub>3</sub>) and group T60 ( $n = 6$ , using 60% O<sub>3</sub>). Under direct vision the mixed gas of O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> (20%, 40% or 60% O<sub>3</sub> concentration) with twice the amount of tumor volume was injected into each study rabbit. Only imitation puncturing was performed in the two rabbits of control group. Every two rabbits from each group were sacrificed immediately after the procedure, and the tumors were removed for fixation. And

every two rabbits from the remaining rabbits in each study group were sacrificed at 4 and 8 days after the procedure respectively. The specimens were collected, fixed, sectioned, and then sent for transmission electron microscopic examination. **Results** In Group

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071245)

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2013.10.012

作者单位: 200433 上海 第二军医大学长海医院放射科(魏 强、方 亮、杨继金、江 旭、李 慧),骨科(霍宁宁),麻醉科(吕 虎、熊源长)

通信作者: 杨继金、熊源长 E-mail: jijinyang@sina.com

T20, mild injury of tumor cells was observed immediately after  $O_3$  injection, which was manifested as slight ridge lysis of mitochondria and sporadic swelling of mitochondria, dilation of endoplasmic reticulum, slight widening of peri-nuclear gap in some cells, but the intercellular space remained normal. In group T40 and group T60, obvious damage of tumor cells was observed immediately after  $O_3$  injection, which was characterized by pronounced swelling of mitochondria, dilation of endoplasmic reticulum, swelling of nucleus, widening of peri-nuclear gap, a burst of cellular membrane and collapse of tissue structure in some tumor cells. On the 4th day, massive necrosis appeared with infiltration of inflammatory cells. Other changes included incomplete cellular membrane, mitochondria-lysosome formation (presenting as black crescent particle of high electron-density) or lysis of mitochondria, dilation of endoplasmic reticulum, partial lysis of cytoplasm, irregular nucleus and widening of peri-nuclear gap, etc., which were more significant and serious in group T60. Vascular endothelial cells appeared to be injured too. All these changes could be observed even on the 8th day after the treatment. The above mentioned changes could be gradually repaired. **Conclusion** After injection of 20% – 60%  $O_3$  into VX-2 tumor in rabbits, different degrees of damage or even death of the tumor cells and the vascular endothelial cells can be caused. The damage is slight when 20%  $O_3$  is used, while the damage is much remarkable when 40% or 60%  $O_3$  is employed. Taking both the safety and therapeutic effect into account the use of 40%  $O_3$  might be more suitable for both experimental and clinical use. The reasonable interval time for repeated injection of  $O_3$  should be 4 – 8 days as certain and definite cellular damage can still be observed at 8 days after the injection. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 830-833)

**[Key words]** ozone; VX-2 tumor; ultra-microstructure; therapy

目前,医用臭氧( $O_3$ )在国际上已广泛用于创伤或褥疮愈合、外周动脉包括心脑血管阻塞性疾病、糖尿病足、口腔疾病、病毒性肝炎、化脓性胆管炎、类风湿性关节炎、关节疼痛等辅助治疗,在我国尤其在椎间盘突出症的治疗上取得了非常明显的疗效<sup>[1-2]</sup>。1980年, Sweet等<sup>[3]</sup>在《Science》杂志上报道了臭氧在体外具有抑制人类肿瘤细胞生长的作用,然而近30年来,臭氧在肿瘤治疗方面的研究却很少<sup>[4-7]</sup>,并且多为臭氧对机体免疫功能调节作用的研究<sup>[4,8-10]</sup>。2008年 Schulz等<sup>[5]</sup>报道,通过腹腔内注射臭氧,可以使部分荷瘤新西兰大白兔的 VX<sub>2</sub> 瘤完全消失,但这一结果遭到质疑<sup>[11]</sup>。张学彬等<sup>[6]</sup>采用臭氧化碘油经肝动脉灌注栓塞治疗兔 VX<sub>2</sub> 瘤,取得了较好的疗效。管京乐和汪蓓蓓<sup>[12]</sup>通过瘤内直接注射不同浓度臭氧治疗兔 VX<sub>2</sub> 瘤,也取得了一定的疗效。本实验旨在通过对兔 VX<sub>2</sub> 瘤内直接注入不同浓度臭氧,观察不同时间肿瘤组织超微结构的改变,以判断不同浓度臭氧对肿瘤细胞的杀伤程度。

## 1 材料与方法

### 1.1 兔 VX<sub>2</sub> 瘤模型制作

取体重 2.5 ~ 3 kg 的新西兰大白兔 20 只,雌雄不限,由第二军医大学附属长海医院动物实验中心提供。兔 VX<sub>2</sub> 瘤株由复旦大学附属中山医院介入放射科惠赠(种植成功的荷瘤大白兔)。以 0.03 g/kg 戊

巴比妥耳缘静脉麻醉成功后,将荷瘤兔仰卧缚于专用手术台上,腹股沟处剪毛,安尔碘消毒后切开皮肤剥离肿瘤,取鱼肉样瘤组织置生理盐水中洗涤 2 次,剪碎并制成 1 mm 大小瘤块,接种于实验兔后腿内侧肌肉内,2 周后进行实验。

### 1.2 实验分组及取材

20 只兔共分 4 组,对照组 2 只, T20 (20% 臭氧)、T40 (40% 臭氧) 和 T60 组 (60% 臭氧) 各 6 只,其中对照组及各治疗组取 2 只兔在实验完成后即刻取材。方法:按前述静脉麻醉、消毒,直视下切开瘤区皮肤,用游标卡尺测量肿瘤长短经,按照公式  $V = 1/2a \times b^2$  计算肿瘤体积<sup>[6]</sup>,并按肿瘤体积 2 倍量不同浓度的  $O_2/O_3$  混合气体用注射器直接注入瘤体内,为减少对肿瘤组织的挤压而引起超微结构改变,即刻处死取材的实验兔均沿肿瘤长径单次穿刺注射,对照组兔仅穿刺肿瘤而不注射气体,沿针道切开肿瘤,取针道周围的瘤组织,置于放有 4℃ 专用固定液 (2.5% 戊二醛) 的硬纸板上,切成 0.5 mm 大小的组织块,并置于固定液内固定,冷藏备用。T20、T40、T60 组各剩余 4 只兔按肿瘤体积 2 倍量直视下用注射器多点穿刺注射不同浓度的  $O_2/O_3$  混合气体,以尽量使臭氧弥散到全部肿瘤组织,然后缝合皮肤、消毒,再放入笼内饲养,分别于术后第 4、8 天各处死 2 只,按前述方法取材、固定保存。臭氧发生器由德国 Humares 公司制备。

### 1.3 制片及电镜观察

将冷藏固定 2 h 以上的标本用缓冲液漂洗后置 1% 四氧化锇中固定 2 h, 再次漂洗, 逐级脱水后, 包埋于 Epon812 中, 常规聚合、切片、铀铅染色, 置铜网上用 Hitachi76 透射电镜观察, 放大倍数 7 500 ~ 25 000。

## 2 结果

电镜观察可见对照组细胞核、细胞膜完整, 线粒体较小且少、密度增高, 内质网尚完整 (图 1), 部分肿瘤细胞退化性变、坏死。肿瘤内的小血管完整。与对照组相比, T20 组注射臭氧后即刻可见肿瘤细胞有轻微损伤, 表现为线粒体轻微溶解, 少许线粒体呈球状肿胀, 内质网扩张, 部分核周间隙增宽 (图 2)。类似改变可以延续至术后第 4、8 天, 但总体改变较轻微, 细胞间隙正常。T40 组注射臭氧后即刻可见肿瘤细胞有明显损伤改变, 表现为线粒体明显

肿胀, 内质网扩张, 细胞核肿胀, 核周间隙增宽, 部分细胞膜崩裂 (图 3), 组织结构崩解。血管内皮细胞异染色质少。术后第 4 天, 可见大片坏死, 肿瘤细胞膜不完整, 溶酶体线粒体形成 (呈新月形黑颗粒) 或线粒体溶解, 内质网扩张, 部分胞质溶解, 细胞核不规则, 核周间隙扩张 (图 4)。术后第 8 天, 仍可看到细胞间隙明显增宽, 内质网扩张, 线粒体密度增高、形状不规则, 提示损伤已部分恢复。T60 组注射臭氧后即刻也可见肿瘤细胞有明显的损伤改变, 表现为线粒体密度增高, 内质网扩张, 细胞核肿胀, 细胞间隙明显增宽, 部分细胞崩解。第 4 天, 组织溶解, 细胞分辨不清, 可见白细胞浸润 (比 T40 组更明显), 炎细胞内可见嗜酸、嗜碱颗粒 (图 5)。瘤周血管内皮细胞外膜分离, 胞质内见空泡变 (图 6)。第 8 天, 仍然可见大片组织崩解, 细胞较分散, 线粒体呈球状肿胀, 崩解细胞及相对正常细胞溶酶体内有高密度影, 内质网明显扩张。

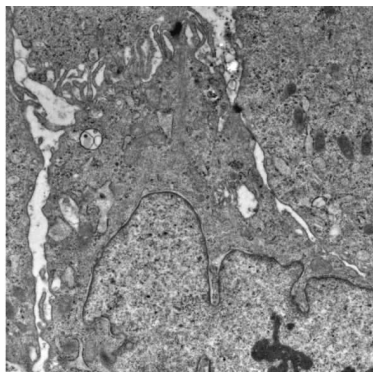


图 1 对照组细胞核、细胞膜完整, 线粒体较小且少、密度增高, 内质网尚完整

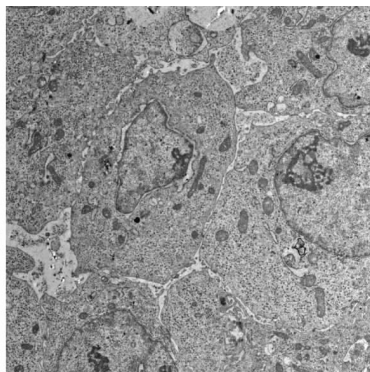


图 2 T20 组注射后即刻少许线粒体呈球状肿胀, 内质网扩张, 部分核周间隙增宽

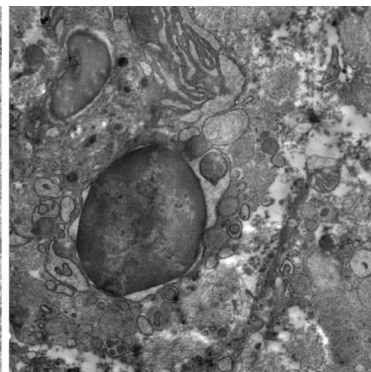


图 3 T40 组注射后即刻线粒体明显肿胀, 内质网扩张, 细胞核肿胀, 核周间隙增宽, 细胞膜崩裂

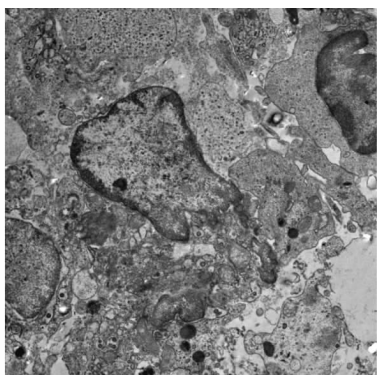


图 4 T40 组注射后第 4 天, 肿瘤细胞膜不完整, 溶酶体线粒体形成 (黑颗粒), 部分胞质溶解, 细胞核不规则, 核周间隙扩张

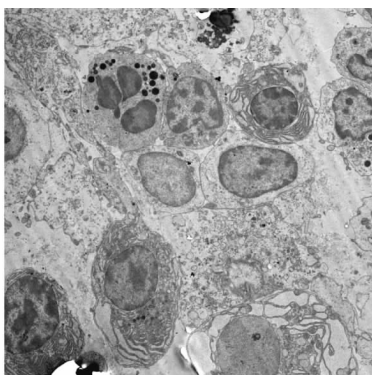


图 5 T60 组注射后第 4 天, 组织溶解, 肿瘤细胞分辨不清, 可见白细胞浸润

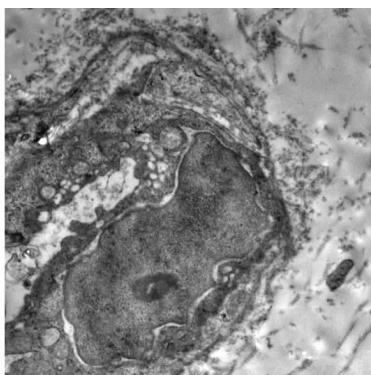


图 6 T60 组注射后第 4 天, 瘤周血管内皮细胞外膜分离, 胞质内见空泡变

### 3 讨论

医用臭氧在临床上应用已有 100 多年,但在肿瘤防治方面的应用研究仅为 40 余年,且多以离体实验为主,在体研究较少。临床上也仅将臭氧作为辅助治疗手段,从刺激相关细胞因子的合成与释放、提高机体免疫功能角度,达到增强抗肿瘤的效果。事实上,臭氧作为强氧化剂,很容易游离出 1 个原子氧(初生态氧),与有机分子反应产生自由基,而使细胞膜上饱和脂肪酸发生脂质过氧化作用,生成的过氧化脂质及其分解产物丙二醛使蛋白质分子交联,影响酶活性,对细胞膜和细胞器造成损伤,从而直接杀灭肿瘤细胞(与消毒杀灭微生物类似)。目前,有关医用臭氧对髓核组织超微结构的影响已有报道<sup>[13]</sup>,但对其直接作用于肿瘤组织造成其损伤的形态学改变尚少见报道。

从本研究可见,臭氧对肿瘤细胞具有即刻的损伤、杀灭作用,并且随着浓度的提高而增强。20%臭氧对肿瘤细胞只是造成了比较轻微的损伤,线粒体轻微嵴溶解,少许呈球状肿胀,内质网扩张,部分核周间隙增宽,并未见大片肿瘤坏死,而 40%的臭氧则直接对肿瘤细胞产生了明显的损伤,可见线粒体明显肿胀,内质网扩张,细胞核肿胀,核周间隙增宽,部分细胞膜崩裂,组织结构崩解。术后第 4 天可见肿瘤细胞膜不完整,溶酶体线粒体形成或线粒体溶解,内质网扩张,部分胞质溶解,细胞核不规则,核周间隙扩张,术后第 8 天仍有类似改变,但逐渐恢复。60%的臭氧对肿瘤造成的损伤较 40%更明显,坏死区周围的炎细胞浸润也更明显。以上不同浓度的臭氧对肿瘤细胞超微结构的影响,在术后第 8 天仍然可见,但与第 4 天相比已有所减轻,提示正在恢复。除了肿瘤细胞本身外,肿瘤组织内血管内皮细胞也有损伤,表现为胞核内异染色质减少、胞质内空泡形成及细胞外膜分离,这意味着肿瘤内微循环会发生障碍,从而影响肿瘤的营养供应及代谢产物的排出,增加肿瘤组织的坏死。

综上所述,单纯从兔 VX<sub>2</sub> 瘤内注射不同浓度臭氧后肿瘤细胞超微结构的改变来看,40%~60%臭氧都可以起到很好的治疗作用,但综合考虑安全性和治疗效果,可能 40%臭氧更好一些,因为在以往的肝脏动物实验中,观察到在注射高浓度的臭

氧时,偶有突然死亡案例发生。另外,如果应用于临床,肯定需要多次、重复治疗,而治疗间隔以 4~8 d 为宜。

### [参考文献]

- [1] 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,2009,30:258-261.
- [2] 高宗根,殷世武,项廷森,等.臭氧联合胶原酶注射与单纯臭氧治疗腰椎间盘突出症的疗效观察[J].介入放射学杂志,2011,20:42-44.
- [3] Sweet F, Kao MS, Lee SC, et al. Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells [J]. Science, 1980, 209: 931-933.
- [4] Witschi H, Wilson DW, Plopper CG. Modulation of N-nitrosodiethylamine-induced hamster lung tumors by ozone [J]. Toxicology, 1993, 77: 193-202.
- [5] Schulz S, Häussler U, Mandic R, et al. Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas [J]. Int J Cancer, 2008, 122: 2360-2367.
- [6] 张学彬,花迎雪,仇晓霞,等.肝动脉臭氧化碘油栓塞治疗兔 VX<sub>2</sub> 肝癌的初步研究 [J]. 介入放射学杂志,2012,21:760-764.
- [7] Selvendiran K, Kuppusamy ML, Ahmed S, et al. Oxygenation inhibits ovarian tumor growth by downregulating STAT3 and cyclin-D1 expressions [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10: 386-390.
- [8] Cannizzaro A, Verga Falzacappa CV, Martinelli M, et al. O<sub>2</sub>(2/3) exposure inhibits cell progression affecting cyclin B1/cdk1 activity in SK-N-SH while induces apoptosis in SK-N-DZ neuroblastoma cells [J]. J Cell Physiol, 2007, 213: 115-125.
- [9] Enzensberger H, Metka M, Salzer H. Effect of a parenteral ozone-oxygen mixture on the concentration of immunoglobulins (IgA, IgG, IgM), of vitamin A and lysozyme activity in patients with cervical Cancer [J]. Geburtshilfe Frauenheilkd, 1987, 47: 343-345.
- [10] Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art [J]. Arch Med Res, 2006, 37: 425-435.
- [11] Bocci V. Does ozone really "cure" cancer? [J]. Int J Cancer, 2008, 123: 1222.
- [12] 管京乐,汪蓓蓓.经皮穿刺瘤内注射医用臭氧治疗兔 VX<sub>2</sub> 移植瘤实验 [J]. 安徽医科大学学报,2010,45:777-779.
- [13] 俞志坚,何晓峰,陈勇,等.臭氧对髓核超微结构的影响 [J]. 介入放射学杂志,2001,10:161-163.

(收稿日期:2013-02-02)

(本文编辑:侯虹鲁)