论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0422-03

# 氯化钆预处理对小鼠 $H_{22}$ 实验性肝癌形成的影响

王梦远,丁 雄,龚建平 (重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010)

**提 要:目的** 探讨氯化钆对小鼠 $H_{22}$ 实验性肝癌形成的影响。**方法** 选取健康雄性昆明小鼠,分成正常对照组(A组)、实验性肝癌接种组(B组)和氯化钆预处理接种组(C组)。分别检测各实验组的术后生存时间、肿瘤质量百分比、肝脏病理组织学及肝组织中细胞因子 TNF-α 的表达情况。**结果** ①B组术后生存时间明显高于C组($P<0.01$),肿瘤质量百分比B组较C组明显降低($P<0.05$)。②对照组肝病理学检查示肝细胞及肝结构正常,试验组可见肿瘤细胞呈巢状或片状排列,不规则,核大,深染,可见较多核分裂象,坏死不明显,肿瘤周边少许炎性细胞浸润。③小鼠血清 TNF-α 的水平各时段B组较C组升高($P<0.05$)。④肝组织细胞因子 TNF-α RT-PCR 半定量分析示B组较C组的 TNF-α 的表达增强。**结论** 氯化钆能够有效地抑制 Kupffer 细胞的免疫活性,从而减弱对小鼠实验性肝癌的抑制作用。

**关键词**:氯化物;Kupffer 细胞;肝癌

**中图法分类号**:R392-33;R730.23;R735.7 **文献标识码**:A

# Effect of gadolinium chloride pretreatment on experimental hepatocarcinogenesis of $H_{22}$ cells in mice

WANG Meng-yuan, DING Xiong, GONG Jian-ping (Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract**: Objective To investigate the effect of gadolinium chloride ($GdCl_3$) on the $H_{22}$ experimental hepatocarcinogenesis in mice. Methods Totally 80 mice were inflicted to experimental hepatoma by implanting $H_{22}$ cells to their liver lobes, and then equally and randomly divided into experimental hepatoma group (B) and $GdCl_3$ pretreatment group (10 mg/kg, C). Another 40 mice served as normal control group (A). Ten mice from every group were killed respectively 7, 14, and 28 d after implantation. The left 10 mice were used for recording survival time and measuring the mass weight. Hepatic pathological histology was observed, and the expression of TNF-α was detected by ELISA and RT-PCR. Results ①Survival time was obviously higher in group B than in group C ($P<0.01$), and the tumor weight percentage was obviously lower in group B than in group C ($P<0.05$). ②Normal control group had normal histological structure around central vein in the liver and hepatic cells. Group B and C showed disordered cell array, atypia of organization, enlarged and darkened nuclei, unobvious apoptosis, and a few inflammatory cells infiltrating around the liver cancer tissue. ③Compared with group C, the serum TNF-α was increased at each time period in group B ($P<0.05$). ④RT-PCR semiquantitative analysis showed TNF-α mRNA was higher at each time period in group B than in group C. Conclusion $GdCl_3$ can inhibit effectively the immunity activity of Kupffer cells, thereby, reduce the $H_{22}$ experimental hepatocarcinogenesis in mice.

**Key words**: Chlorides; Kupffer cells; hepatoma

目前对 Kupffer 细胞(KCs)的研究是个热点,但就KCs与肝癌发生的相关性方面还比较少。本研究就氯化钆预处理对小鼠实验性肝癌形成的影响进行一项观察性研究,为进一步开展 KCs 与肝癌的关系实验研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

4周龄雄性昆明小鼠120只,体质量(25±5)g,由重庆医科大学实验动物中心提供。分成正常对照组(A组),实验性肝癌

作者简介:王梦远(1977-),男,重庆市巴南区人,硕士研究生,主治医师,主要从事肝癌发病及免疫方面的研究。电话:13258212189

通讯作者:龚建平,E-mail: gongjianping11@hotmail.com

收稿日期:2006-06-30;修回日期:2006-11-15

接种组（B 组），氯化钆预处理接种组（C 组），每组 40 只。

### 1.2　实验性肝癌动物模型制作

本实验瘤株采用 $H_{22}$ 肿瘤细胞株（由重庆医科大学肿瘤超声研究所马芳博士惠赠）。将冻存的瘤株复苏，体外培养至细胞数（2～6）×$10^6$/ml 时，取昆明小鼠 5 只，分别用 2 ml 注入小鼠腹腔，共 10～14 d 血性腹水生成。抽取腹水 5～10 ml 在常温下 500 r/min 离心 3 min，弃上清液，用生理盐水洗涤，反复 3 次后取肿瘤细胞悬液直接注射肝右叶包膜下。种植后 2 周即可出现肝脏的包块 0.3～0.5 cm，呈弥漫性分布。应用此方法制作小鼠肝癌模型成功率达 100%。氯化钆预处理组则是由接种小鼠尾静脉注入浓度为 0.25% 的氯化钆溶液（10 mg/kg），实验前 1 周开始，隔日 1 次共 2 次。

### 1.3　病理学观察及实验组小鼠生存时间统计

实验组接种及接受氯化钆预处理后 7、14、28 d 后，分别处死各实验组小鼠，每次 10 只。肉眼观察肿瘤形成情况；切取癌灶及正常肝组织，并同时称量癌灶组织质量及患肝的总质量，计算肿瘤质量百分比。用 10% 福尔马林溶液固定，然后石蜡包埋，切片，HE 染色，在光镜下观察组织病理学变化。同时进行实验组间肝癌小鼠成活时间的比较，样本量取 10 只。

### 1.4　血清 TNF-α 测定

实验组接种及接受氯化钆预处理后 7、14、28 d 后，自小鼠肝下下腔静脉取血 1 ml，离心留取上清液冷冻待测。用 ELISA 法测定，试剂系博士德公司的夹心法 ELISA 试剂盒，具体操作见产品说明书。

### 1.5　肝组织 TNF-α RT-PCR 半定量分析

逆转录聚合酶链式（RT-PCR）检测：术后第 14、28 天取肝组织，采用 RT-PCR 检测细胞因子 TNF-α mRNA 表达情况。① 肝组织总 RNA 提取及 cDNA 合成：采用上海华舜生物工程有限公司的小量组织/细胞总 RNA 快速抽提纯化试剂盒，具体方法按试剂盒说明进行。取 0.5 ml RNA 产物，用 RT-PCR 试剂盒（Roche，USA）将其逆转录为互补 DNA（cDNA），－74 ℃保存待用。② PCR 反应：取逆转录产物 cDNA 扩增 TNF-α 以及 β-actin 引物（上游：5′-CTTCTTTGCAGCTCCTTCGT-3′，下游：5′-TTCTCCATGTCGTCCCAGT-3′；产物大小：300 bp）由北京赛百盛基因技术有限公司设计并合成，作 PCR 产物依循环数递增曲线，找出最适循环数。最终扩增条件均为：94 ℃变性 1 min，58 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，共 40 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min。用琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物，EB 染色，凝胶呈像系统和图像分析系统观察并半定量计算 PCR 产物的相对表达量，结果以相对光密度值表示。

### 1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件，两组间比较行配对 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　病理学改变

光镜下观察，A 组小鼠肝细胞均呈圆形，细胞质丰富，核浆比例协调，无肝细胞变性坏死或再生表现，汇管区结构正常（图 1）。B、C 组可见肿瘤细胞呈巢状或片状排列，不规则，核大，深染，可见较多核分裂象，坏死不明显，肿瘤周边少许炎性细胞浸润（图 2）。

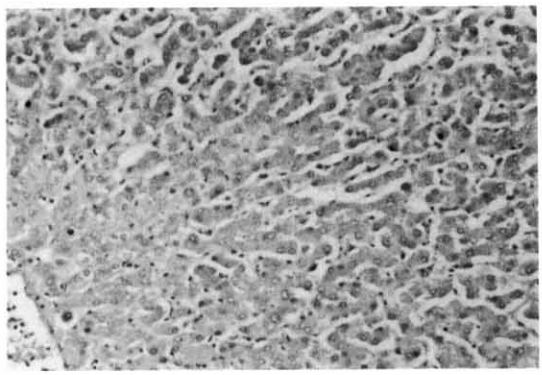


**图 1　正常对照组肝脏组织结构**　（HE×200）

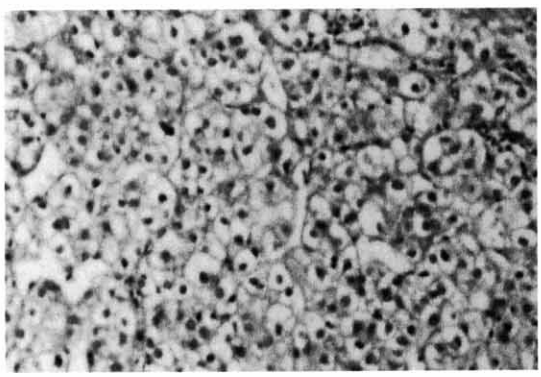


**图 2　实验性肝癌接种组肝癌组织结构**　（HE×300）

### 2.2　血清 TNF-α 改变

实验组与正常对照组小鼠血清 TNF-α 水平见表 1。随着肿瘤接种时间的延长，B、C 组的 TNF-α 水平逐渐升高，同时段 A 组与实验组及实验组之间的相互比较有统计学意义（$P<0.05$）。

**表 1　小鼠血清 TNF-α 水平（$\rho_B$/ng·$L^{-1}$，$n=10$，$\bar{x} \pm s$）**

| 组别 | 第 1 周 | 第 2 周 | 第 4 周 |
|---|---|---|---|
| A 组 | 2.633 ± 0.252 | 2.645 ± 0.239 | 2.635 ± 0.237 |
| B 组 | 3.278 ± 0.362[a] | 4.267 ± 0.342[a] | 4.977 ± 0.357[a] |
| C 组 | 3.026 ± 0.215[ab] | 3.564 ± 0.254[ab] | 3.964 ± 0.205[ab] |

a：$P<0.05$，与 A 组比较；b：$P<0.05$，与 B 组比较

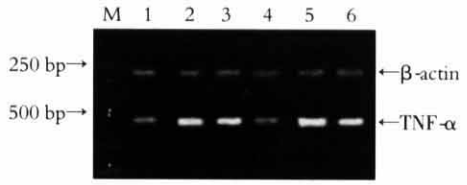
### 2.3　实验组小鼠生存时间及肿瘤质量占患肝百分比比较

B 组生存时间较氯化钆预处理组要明显延长［分别为（40.5 ± 3.98）d 和（30.5 ± 3.92）d，$P<0.01$］。第 2、4 周 B 组肿瘤质量百分比分别为（12.77 ± 2.50）%、（22.58 ± 2.71）%，C 组分别为（17.55 ± 3.03）%、（32.11 ± 3.51）%。肿瘤的质量百分比 B 组明显较 C 组轻（$P<0.01$），体积也明显要小。

### 2.4　肝组织细胞因子 TNF-α RT-PCR 半定量分析

肝组织 TNF-α RT-PCR 半定量分析结果见图 3、4。第 2 周：B 组的 TNF-α 的表达较 A、C 组增强；第 4 周：TNF-α 的表达

较第2周增强，且B组的表达较A、C组增强，C组的表达较对照组也是增强的（$P<0.05$）。




M：标准；1：A组2周；2：B组2周；3：C组2周；4：A组4周；5：B组4周；6：C组4周

**图3 肝组织 TNF-α 的表达**

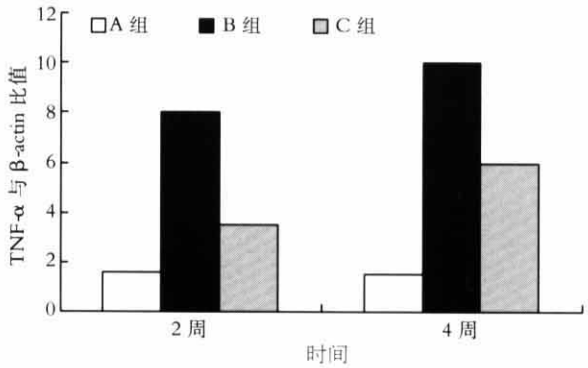



**图4 肝组织 TNF-α 表达的半定量分析**

## 3 讨论

近年来，国内外研究者发现，氯化钆对肝脏KCs有特异的抑制作用，但不影响肝脏以外的其他单核-巨噬细胞系统[1]，被越来越多地用于有关KCs的研究中。KCs占肝内巨噬细胞的80%，作为单核巨噬细胞系统的一部分，在机体对肝脏肿瘤的防御中具有重要意义，其细胞表面受体在其功能发挥中起着重要的桥梁作用。$GdCl_3$选择性地抑制了KCs，抑制了其合成及分泌多种细胞因子的作用，循环血中TNF-α水平的降低反应了证明了这一点[2]。

巨噬细胞在机体的免疫防御中具有重要作用，激活的巨噬细胞对肿瘤细胞的作用途径主要有：吞噬肿瘤细胞[3]；通过CD16（FcγRⅢ），借助抗瘤抗体的ADCC作用杀伤瘤细胞[4]；分泌TNF-α及IL-1等细胞因子，直接或间接地发挥杀瘤作用[5]；产生某些酶及活性氧分子直接杀伤或抑制肿瘤细胞生长[6]。

本研究结果表明，荷瘤小鼠（B组）血清TNF-α表达水平明显较A组为高，提示KCs在没有受到抑制的情况下功能正常而且在肿瘤的刺激下激活分泌TNF-α，所以此组较C组表达增强，C组则较B组明显降低；患肝组织TNF-α RT-PCR半定量分析结果也显示C组的TNF-α表达明显降低。氯化钆预处理组的肿瘤质量占患肝质量的百分比的显著升高也提示我们考虑氯化钆抑制了KCs的功能后，实验小鼠肿瘤的生长加快，以及对实验组小鼠生存时间的比较得出C组明显较B组的荷瘤生存时间缩短。以上结果提示KCs的功能被抑制后实验小鼠的肿瘤生长加快，生存时间缩短，表明KCs对肝脏肿瘤的生长具有抑制作用，其具体的机制还有待更深一步的研究。

（致谢：本研究在本院重庆市肝胆外科重点实验完成，特此致谢！）

**参考文献：**

[1] Lee C M, Yeoh G C, Olynyk J K. Differential effects of gadolinium chloride on Kupffer cells *in vivo* and *in vitro*[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 36(3): 481-488.

[2] Gloor B, Blinman T A, Rigberg D A, *et al*. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats[J]. Pancreas, 2000, 21(4): 414-420.

[3] Timmers M, Vekemans K, Vermijlen D, *et al*. Confocal laser scanning microscopic study of the killing of metastatic colon carcinoma cells by kupffer cells in the early onset of hepatic metastasis[J]. Comp Hepatol, 2004, 3(Suppl 1): S50-S52.

[4] Clynes R A, Towers T L, Presta L G, *et al*. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytoxicity against tumor targets[J]. Nat Med, 2000, 6(4): 443-446.

[5] Karpoff H M, D'Angelica M, Bliar S, *et al*. Prevention of hepatic tumor metastases in rats with herpes viral vaccines and gamma-interferon[J]. J Clin Invest, 1997, 99(4): 799-804.

[6] Sturm J W, Magdeburg R, Berger K, *et al*. Influence of TNFA on the formation of liver metastases in a syngenic mouse model[J]. Int J Cancer, 2003, 107(1): 11-21.

（编辑 龙 亮）

## 作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每3位分1节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如2,431改为2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部