DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.023
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
674 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0674-03

胰周动脉结扎对裸鼠胰腺移植癌及癌周组织的影响

郑树国,何振平,李 昆 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 为动脉结扎及栓塞疗法在胰腺癌的临床应用提供基础研究资料。方法 在建立人胰腺癌细胞株裸鼠胰腺原位移植瘤模型的基础上,观察结扎荷瘤裸鼠胃十二指肠动脉、胰十二指肠下动脉及背胰动脉对裸鼠胰腺移植癌及癌周胰腺组织的血流量、病理形态学及对移植癌增殖动力学的影响。结果 结扎组移植癌及癌周胰腺组织血流量术中分别较对照组降低59%和48%,术后3、7、14 d均显著低于同时相点对照组;光镜下结扎组移植癌呈大片凝固坏死,周围有渐进性坏死细胞及炎症细胞浸润;癌周胰腺组织术后早期轻度间质水肿,无出血坏死性改变,后期出现腺泡萎缩破坏,可见广泛纤维化及淋巴细胞浸润;增殖动力学观察结果显示结扎组移植癌生长缓慢,倍增时间延长,移植癌体积、癌细胞增殖指数及蛋白质含量术后3、7、14 d均显著低于对照组($P<0.01$)。结论 胰周动脉结扎后裸鼠胰腺移植癌及癌周胰腺组织的血流量显著降低,由此所产生的缺血效应能有效地抑制移植癌的生长和增殖。

关键词:动脉结扎及栓塞疗法;胰腺肿瘤;裸鼠
中图法分类号:R322.121;R364.12;R735.9 文献标识码:A

Effects of artery ligation arround pancreas on the transplanted cancerous and peri-cancerous tissue in pancereas of the nude mice

ZHENG Shu-guo, HE Zhen-ping, LI Kun (Hepatobiliary Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To provide experimental evidence for the clinical application of arterial occlusion and embolization therapy in the treatment of pancreatic cancer. Methods After establishing of the animal model of transplanting human pancreatic cancer cell line into the pancreas in nude mice, the blood flow and the pathological changes of the transplanted cancerous and peri-cancerous tissue were observed before and after the ligation of the gastroduodenal, inferior pancreaticoduodenal and dorsal pancreatic arteries. Proliferative dynamics of the transplanted cancer was also investigated at the same time. Results The blood flow of the transplanted cancerous and the peri-cancerous tissue in ligation group were decreased to 59% and 48% of that of the control during operation and it remained significantly lower 3, 7 and 14 d after operation when compared with control. Large area of necrotic tissue and inflammatory cells were observed in the transplanted cancer in ligation group. No hemorrhage and necrosis was seen despite the presence of mild edema and atrophy in cancerous and peri-cancerous tissue in early post operative days, while extensive fibrosis and infiltration of lymphocytes were found in the later days postoperatively. Proliferative dynamics showed the transplanted cancer was slower in growth and doubling time prolonged in the ligation group than in the control. The size of transplanted cancer, the proliferative index and protein content of the cancer cells were significantly lower in the ligation group than in the control at 3, 7, 14 d after operation ($P<0.01$). Conclusion The blood flow decrease significantly in the transplanted cancerous and the peri-cancerous tissue after the ligation of the arteries arround pancreas, and this ischemic effect can inhibit effectively the growth and proliferation of the transplanted cancer.

Key words: arterial occlusion and embolization therapy; pancreatic neoplasm; nude Mouse

胰腺癌的早期诊断困难,至就诊时约70%患者已丧失根治切除的机会,大量未能切除病灶的中晚期患者对放、化疗敏感性差,预后恶劣,急需探讨有效的治疗方法[1]。借鉴动脉结扎及栓塞疗法在肝癌及其他一些恶性肿瘤治疗中的成功经验,我们在建立人胰腺癌细胞株裸鼠胰腺原位移植瘤模型的基础上,观察结扎荷瘤裸鼠胃十二指肠动脉、胰十二指肠下动脉及背胰动脉对裸鼠胰腺移植癌和癌周胰腺组织的血流量、病理形态学及对移植癌增殖动力学的影响,为动脉结扎及栓塞疗法在胰腺癌的临床应用提供基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 细胞培养、模型建立及实验分组

人胰腺癌细胞株PC-3引自北京协和医院病理科[2],PC-3来源于一女性胰腺中分化导管细胞腺癌病人,将其常规培养于RPMI-1640培养基中,定期更换培养液,每隔3~5 d以0.25%的胰酶消化,按1∶2比例传代。人胰腺癌裸鼠胰腺原位移植瘤模型的建立参照文献[3]稍加改进:取指数生长期PC-3细胞,0.25%胰酶消化脱壁,离心、去上清,以RPMI-1640液稀释,0.04%台盼蓝染色细胞计数,调整细胞浓度为10×10^6/ml,裸鼠以0.1%戊巴比妥钠35 mg/kg腹腔注射麻醉,无菌条件下开腹,将RPMI-1640液0.1 ml(内含10^6个活细胞)注入胰腺右叶,术后禁食12 h,自由饮水。

本研究共用BALB/c-nu/nu裸鼠35只,均系SPF动物,鼠龄6~8周,体重(20±2.0)g,雌雄兼用,饲养条件符合无菌动物要求。至接种后4周末,35只裸鼠中有30只长出肿瘤,作为研究

作者简介:郑树国(1965-),男,河南省潢川县人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事胰腺肿瘤方面的研究,发表论文22篇。电话:(023)68754000-73078

收稿日期:2000-06-18;修回日期:2001-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

对象, 并随机分为 2 组: ① 结扎组(n= 15): 开腹显露胰腺及移植癌, 结扎胃十二指肠动脉、胰十二指肠下动脉及背胰动脉, 分两层关腹; ② 对照组(n= 15): 不结扎血管, 余步骤同结扎组。每组均于术中及术后 3、7、14 d 进行指标观测。

1.2　观察指标及方法

1.2.1　移植癌及癌周胰腺组织血流量测定　　采用激光多普勒法, 用 LDF-Ⅱ型微循环多普勒血流计(南开大学研制), 血流量单位用多普勒信号的电压值 mV 表示。

1.2.2　移植癌群体增殖动力学观察　　测量移植癌长(L)、宽(W)、高(H)径, 根据公式 V=π/ 6. LWH 计算移植癌体积(V), 按各时相点移植癌大小分别描记结扎组及对照组移植癌的生长曲线, 并根据公式 TD= 0. 1 T/ LogDT-LogDO 计算移植癌倍增时间(TD: 倍增时间; DO: 观察开始时移植癌直径; DT: 观察结束时移植癌直径; T: 观察时间)。

1.2.3　移植癌细胞增殖指数及蛋白质含量测定　　分别于规定时相点取新鲜移植癌组织 0. 2 g, 用酶学方法制备单细胞悬液, 70% 冷乙醇固定, 碘化丙啶一步插入法 DNA 荧光染色, FACS-400 型流式细胞仪(美国 BD 公司)测定细胞周期, 每份样本随机测定 10^4 个细胞, 根据公式 PI= S+ G_2/ M/ G_0/ G_1+ S+ G_2/ M计算移植癌细胞增殖指数(PI)。以异硫氰基荧光素染色测定移植癌细胞蛋白质含量。

1.2.4　移植癌及癌周胰腺组织病理形态学观察　　取部分移植癌及癌周胰腺组织, 常规切片, HE 染色, 光镜观察。

1.3　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

2.1　移植癌及癌周胰腺组织血流量变化

结扎组移植癌及癌周胰腺组织血流量术中分别较对照组下降 59% 和 48%, 术后 3、7、14 d 均显著低于同时相点对照组(P< 0. 01), 见表 1。

表 1　移植癌及癌周胰腺组织血流量变化(mV, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of blood flow in the transplanted cancer and pancreatic tissue around cancerous focus (mV, $\bar{x}\pm s$)

Group	Intraoperation	Post-operation time (d)		
		3	7	14
Control				
Transplanted cancer	73. 00±4. 00	69. 60±3. 36	67. 80±5. 80	60. 80±6. 01
Pancreatic tissue	41. 20±3. 11	40. 40±3. 36	39. 80±5. 89	39. 20±4. 76
Occlusion				
Transplanted cancer	30. 40±3. 39 *	29. 00±3. 21 *	33. 40±3. 21 *	51. 40±5. 94 *
Pancreatic tissue	21. 60±2. 40 *	20. 00±2. 25 *	23. 20±3. 15 *	22. 40±2. 07 *

*: P< 0. 05 *vs* control

2.2　移植癌及癌周胰腺组织的病理形态学改变

光镜下, 移植癌细胞排列成腺腔样或聚集成束, 核大而异形, 核仁明显。对照组移植癌细胞密度高, 癌周胰腺组织小叶轮廓清晰; 结扎组移植癌呈大片凝固坏死, 并可见渐进性坏死细胞、炎症细胞浸润及纤维组织增生, 癌周胰腺组织术后 3 d 可见轻度间质水肿, 少许炎症细胞浸润, 无出血坏死性改变, 术后 14 d 可见腺泡萎缩、结构破坏, 出现广泛纤维化及淋巴细胞浸润。

2.3　移植癌群体增殖动力学

对照组移植癌体积增长迅速, 呈指数生长趋势, 倍增时间为 3. 69 d, 结扎组移植癌生长缓慢, 术后 3、7、14 d 移植癌体积均显著低于同时相点对照组, 倍增时间为 6. 86 d, 见表 2。

2.4　移植癌细胞增殖指数及蛋白质含量

结扎组移植癌细胞增殖指数及蛋白质含量术后 3、7、14 d 均显著低于同时相点对照组(P< 0. 01), 见表 3。

表 2　各组移植癌体积(mm^3)及倍增时间($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Volume(mm^3) and time(d) of volume doubling in the two groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	Volume (mm^3)				Times of volume doubling (d)
	Intraoperation (n= 5)	3 d (n= 5)	7 d (n= 5)	14 d (n= 5)	
Control	67. 72±6. 13	93. 43±9. 33	308. 77±31. 44	912. 27±76. 40	3. 69±0. 22
Occlusion	66. 80±5. 18	67. 61±7. 02 *	75. 78±8. 45 *	355. 66±34. 98 *	6. 86±0. 51 *

*: P< 0. 05 *vs* control

表 3　移植癌细胞增殖指数及蛋白含量(荧光值)变化

Tab 3　Changes of proliferative index and protein content in the transplanted cancer cell

Group	Post-operation time (d)		
	3 (n= 5)	7 (n= 5)	14 (n= 5)
Control			
Proliferative index	0. 3922±0. 0386	0. 3850±0. 0416	0. 3364±0. 0340
Protein content	211. 32±31. 80	204. 45±25. 34	168. 78±20. 13
Occlusion			
Proliferative index	0. 2338±0. 328 *	0. 2480±0. 0303 *	0. 2856±0. 0313 *
Protein content	86. 34±10. 18 *	89. 41±9. 37 *	110. 21±16. 45 *

*: P< 0. 01 *vs* control

3　讨论

本研究成功地将人胰腺癌细胞株 PC-3 移植于裸鼠胰腺右叶, 模拟了人胰腺癌的常见发病部位及组织学类型。移植癌生长在胰腺原位, 局部微环境、血液循环及淋巴引流特征等与人类胰头癌十分相似, 在形态、生长、浸润转移等方面与其来源肿瘤保持一致。应用于胰腺癌实验性治疗的研究较人胰腺癌裸鼠皮下移植瘤模型及动物源性胰腺自发瘤及诱发瘤模型更接近人体实际情况, 且具有诱导期短、易于复制及肿瘤获得率高等优点。

血流量测定结果显示结扎组移植癌及癌周胰腺组织血流量术中分别较对照组降低 59% 和 48%, 术后 3、7、14 d 均显著低于对照组。提示结扎荷癌裸鼠胃十二肠动脉、胰十二肠下动脉及背胰动脉能诱导胰腺右叶持续性缺血, 且移植癌的缺血程度较癌周胰腺组织更为严重。本研究发现结扎组移植癌呈大片凝固性坏死, 癌周胰腺组织术后早期轻度间质水肿, 未见出血坏死性改变, 后期出现腺泡萎缩, 纤维化及淋巴细胞浸润, 符合慢性缺血性胰腺炎的组织病理学特征, 与 Toyama 等[4] 的报道相仿。研究表明, 胰的各动脉分支

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

在胰腺实质内形成纵横交错的立体网络吻合，结扎或栓塞胰的主要动脉后不会造成坏死性胰腺炎等严重并发症[5,6]。本组癌周胰腺组织无出血坏死性改变，而移植癌则出现大片凝固性坏死，可能是由于移植癌的缺血程度较癌周胰腺组织更为严重或移植癌较癌周胰腺组织对缺血更为敏感所致。对移植癌增殖动力学观察发现，对照组移植癌体积增长迅速，呈指数生长趋势，结扎组移植癌生长缓慢，和对照组比移植癌体积显著缩小，倍增时间延长，提示结扎胰周动脉所诱导的胰腺缺血能有效地抑制移植癌的生长。DNA 合成及有丝分裂是细胞增殖的标志，正常的细胞合成是细胞周期顺利进行必不可少的。本研究采用流式细胞仪测定移植癌细胞周期，换算成增殖指数，并测定蛋白质含量，结果显示结扎组移植癌细胞增殖指数及蛋白质含量术后 3、7、14 d 均显著低于同时相点对照组，提示结扎后缺血阻碍了移植癌细胞从 G_0/G_1 期向 S、G_2/M 期的过度，使绝大部分细胞阻滞在 G_0/G_1 期，表明结扎后缺血抑制了移植癌细胞 DNA 及蛋白质的合成，使细胞周期的正常运行受阻，进而抑制移植癌细胞的分裂增殖。

动脉结扎及栓塞疗法能否安全有效的应用于临床胰腺癌的治疗主要取决于 3 个因素：①胰周动脉结扎后胰腺癌的血流量是否显著降低，即胰周动脉结扎后胰腺癌是否呈持续缺血状态；②胰腺癌对缺血的敏感性，即在缺血状态下癌的生长是否能得到有效的控制；③胰周动脉结扎所造成的缺血是否会导致急性坏死性胰腺炎等严重并发症[7]。本研究在动物模型上初步观察了胰周动脉结扎对胰腺癌及癌周胰腺组织的影响，结果表明胰周动脉结扎所产生的缺血效应能有效地抑制移植性胰腺癌的生长，从机制和方法上模拟了动脉结扎及栓塞疗法对临床胰腺癌的作用过程，将这一方法应用于中晚期胰腺癌患者，起到了缓解症状、延长生存期的疗效[8]。胰周动脉结扎后期有无继发性糖尿病的发生以及如何准确地掌握动脉结扎及栓塞的尺度以最大限度地发挥其治疗作用，而又不造成对周围胰腺组织的严重损害有待进一步研究。

参考文献：

[1] Berberat P O, Friess H, Kleff J, *et al*. Prevention and treatment of complications in pancreatic surgery[J]. Dig Surg, 1999, 16(4): 327－336.

[2] 崔全才，陈 杰，顾长芳，等. 一株人胰腺癌细胞系的建立及其特性[J]. 基础医学与临床，1992，12(6)：50－51.

[3] Bruns C J, Harbison M T, Kuniyasu H, *et al*. *In vivo* selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice[J]. Neoplasia, 1999, 1(1): 50－62.

[4] Toyama M T, Patel A G, Ngugen T, *et al*. Effects of ethanol on pancreatic interstitial PH and blood flow in cats with chronic pancreatitis[J]. Ann Surg, 1997, 225(2): 223－228.

[5] Khoursheed M, Croth Harrey M A, Gould D A. Embolization in the palliation of complications of inoperable primary pancreatic neoplasms[J]. Clin Radiol, 1994, 49(11): 784－786.

[6] Homma H, Doi T, Mezawa S, *et al*. A novel arterial infusion chemotherapy for the treatment of patients with advanced pancreatic carcinoma after vascular supply distribution via superselective embolization[J]. Cancer, 2000, 89(2): 303－313.

[7] 郑树国，何振平，段恒春. 裸鼠胰腺移植癌缺血治疗模型的建立及评价[J]. 肝胆外科杂志，1999，7(5)：389－391.

[8] 郑树国，何振平，李智华. 不能切除的胰腺癌行胰周动脉结扎及区域性化疗的临床应用报告[J]. 肝胆外科杂志，1999，7(1)：28－30.

（编辑 薛国文）

（上接 673 页）

2.3 药物不良反应

治疗组出现不良反应者 4 例，占 2 %，其表现为消化道反应：腹泻、恶心、呕吐，上腹部不适。在停药及应用吗叮啉、思密达对症后症状缓解，1 例转氨酶升高。

3 讨论

急性呼吸道感染以肺炎链球菌及流感嗜血杆菌为常见的病原菌[2,3]，同时肺炎支原体、细菌 L 型感染有增高趋势。本组病例外周血白细胞> 10.0×10^9/ L，中性粒细胞> 0.60 者分别达 85%和 80.7%，抗生素治疗是适应症。希舒美为第 2 代大环内酯抗生素，与第 1 代相比，具有生物利用度好，血浆和组织浓度高，可透入细胞内，体内抗菌作用强，半衰期长，给药次数少等优点。同时它抗菌谱广，不仅对革兰阳性(G^+)菌和部分革兰阴性菌(包括流感嗜血杆菌、L 菌)具有抗菌作用，对衣原体、支原体、军团菌、弯曲菌和幽门螺杆菌及一些对其它大环内酯抗生素不敏感的微生物也具有较好的抗菌的作用。据报道，对 1 组 59 例小儿肺炎经阿奇霉素治疗 3 d，其致病菌的清除率为 91.5%，治疗上呼吸道感染 36 例，总有效率 100%，治疗下呼吸道感染 96 例，总有效率为 98.5%[4]。本观察也证实其治疗呼吸道感染效果良好，总有效率为 97.7%。

同时希舒美，口服吸收迅速，2～3 h 后血药浓度达到高峰，不受食物影响，并分布到人体各组织，独特的药动特性使组织浓度比血药浓度高 15～50 倍。故治疗急性呼吸道感染显效快，疗程短，剂量仅为红霉素的 1/15～1/10，本观察中治疗 3 d 退热例数及显效率均与对照组有显著差异，可说明这一点。

本观察希舒美发生不良反应者 4 例，发生率低，仅为消化道反应，在停药及对症处理后，均能缓解，1 例肝转氨酶升高，是本身疾病所致，还是药物所致，尚难定论。总之，希舒美治疗小儿呼吸道感染疗效肯定，在缩短退热时间及缩短疗程方面效果尤佳，家长反应依从性好，且具有不良反应发生率低，给药次数少优点，值得儿科推广应用。

关键词：希舒美；小儿；急性呼吸道感染
中图法分类号：R725.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴瑞萍，等 主编. 实用儿科学[M]. 第 6 版. 北京：人民卫生出版社，1996. 1 132－1 179.

[2] 杨永弘，沈叙庄. 小儿急性呼吸道感染的病原学的进展[J]. 中国实用儿科杂志，1997，12(1)：2－3.

[3] 胡仪吉. 小儿急性呼吸道感染防治中的抗生素合理使用[J]. 中国实用儿科杂志，1997，12(1)：4－6.

[4] 董宗祈. 大环内酯类抗生素研究进展及其在儿科的临床应用[J]. 中国实用儿科杂志，1999，14(4)：236－238.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net