DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.007

文章编号: 1000-5404(1999)11-0792-04

重组人肿瘤坏死因子对人结肠癌 SW-480细胞的体内作用

黄显凯,张胜本,饶本强 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042)

【提要】 目的:探讨 TNF抗大肠癌的作用及其机制。方法:建立人结肠腺癌裸小鼠移植瘤模型,观察 rhTNF对人结肠腺癌 SW-480裸小鼠移植瘤重量、组织学和超微结构及细胞周期动力学的影响。结果:rhTNF对人结肠腺癌裸小鼠移植瘤具有抑制作用,抑瘤作用呈剂量依赖性;结肠癌细胞围绕血管出现片状坏死,并有大量炎细胞浸润;rhTNF能明显抑制结肠癌细胞从 G_0/G_1期过渡到 S和 G_2M期,使细胞增殖指数显著降低,DNA抑制率呈剂量依赖性。结论:rhTNF对大肠癌生长具有抑制作用,可能与 rhTNF诱导的炎症反应及血管损伤有关;rhTNF能特异性抑制大肠癌细胞从 G_0/G_1期向 S和 G_2M期过渡,进而抑制 DNA合成。

关键词 肿瘤坏死因子;结肠肿瘤;SW-480细胞
中图法分类号 R730.3;R735.35 文献标识码 A

本文观察重组人肿瘤坏死因子(rhTNF)对人结肠癌裸小鼠移植瘤的作用,旨在阐明 TNF对大肠癌的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 人结肠腺癌裸小鼠移植瘤模型的建立

人结肠高分化腺癌细胞株 SW-480由重庆医科大学病生教研室提供。第三军医大学实验动物中心提供 BALB/c-nu/nu无胸腺裸小鼠。鼠龄 5~7周,体重(20±2)g,雌雄不拘,实验时按无菌原则操作。初代移植瘤采用对数生长期 SW-480细胞消化后,调整细胞浓度至 4×10^6/ml,取 0.2 ml接种于裸小鼠腹部或颈背部皮下。初代肿瘤长至 1 cm×1 cm×1 cm时,选择接种成功的裸小鼠拉颈处死,无菌剥离瘤体,用含双抗的 Hanks液洗两次,剪成 1~2 mm大小瘤块,经套管针接种于裸小鼠上述部位进行传代。传代 5次,每次接种裸小鼠 2~3只。

1.2 rhTNF对人结肠腺癌 SW-480裸小鼠移植瘤的作用

1.2.1 实验分组 将传代后稳定生长的人结肠腺癌移植瘤按前述方法接种于裸小鼠,共 30只,随机分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和腹腔注射组,每组 6只。肿瘤长至 5~8 mm时,按表 1实验,采用瘤内注射(i.t)和腹腔注射(i.p)隔日给药,共 10次,末次用药后 24 h处死裸小鼠。

表 1 药品用量及途径

Tab 1 Dose and route of use of rhTNF

Group	Drug(/time)	Method
Control	saline 1 ml	i.t
Low dose	rhTNF 500 u	i.t
Mid dose	rhTNF 2 000 u	i.t
High dose	rhTNF 10 000 u	i.t
Peritoneum	rhTNF 10 000 u	i.p

1.2.2 瘤重变化 处死裸小鼠剥取肿瘤后,清除脂肪等非肿瘤组织,称量瘤重,按公式计算瘤重抑瘤率:

$$\text{抑瘤率} = \left(1-\frac{\text{用药组瘤重}}{\text{对照组瘤重}}\right)\times 100\%$$

1.2.3 组织学和超微结构改变 每组均取 4只裸小鼠,剥离移植瘤,10%福尔马林固定,石腊包埋,常规切片作 HE染色,光镜观察。同时切取 3~4块 1 mm大小的第五代移植瘤组织,3%戊二醛和 1% OsO_4固定,丙酮脱水,Epon-812包埋,超薄切片(500~700A),铀-铅双染色,300 X型透射电子显微镜(SEM)下观察。

1.2.4 细胞周期动力学变化[1] 获取第 6代肿瘤组织,Hanks液冲洗 3次,将肿瘤剪切成 1 mm碎块,Hanks液冲洗 2次,消化液(0.25%胰蛋白酶与 0.05%胶原酶 1∶1)37°C消化 20~30 min,800 r离心 5~8 min,Hanks液漂洗 2~3 min,300目钢筛网除去未充分消化的组织,制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10/ml,70%乙醇固定。选用碘化丙啶(PI)DNA染色法,PBS液洗去固定液,加入 PI一步染液 1 ml,室温放置 30 min,流式细胞仪测定。以 70 mV的氩离子激光器为激发光源,激发波长为 488 nm,测定 DNA-蛋白质的荧光强度后,收集 10 000个细胞的数据进行分析和处理。采用 Barlogie细胞同期分析法,将处于不同时期的细胞分为三部分: G_0/G_1期、S期、G_2M期细胞。每组选取 1只裸小鼠移植瘤,按公式计算细胞增殖指数(proliferation index,PI)和 DNA抑制率。

$$PI=\frac{S+G_2M}{G_0/G_1+S+G_2M}\times 100\%$$

$$\text{DNA抑制率} = \left(1-\frac{\text{用药组 } S+G_2M}{\text{对照组 } S+G_2M}\right)\times 100\%$$

1.3 统计学处理

数据值均以 $\bar{x}\pm s$表示,按需要进行 χ^2检验或 t检验。$P<0.05$表示差异显著,$P<0.01$表示差异非常显著。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39270656)
作者简介:黄显凯,男,44岁,副教授,博士
收稿日期:1999-01-07;修回日期:1999-09-01

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

2 结果

2.1 移植瘤生长情况

初代移植瘤接种成功 2只,第二代以后接种成功率 100%,至第 6代以后肿瘤生长速度稳定。潜伏期 7~ 8 d,第二周末直径可达 0.5~ 0.6 cm,第三周起肿瘤生长加快,至第 5周末直径平均可达 1.9~ 2.2 cm,此时表面呈结节状,个别肿瘤表面有破溃及出血。

2.2 rhTNF对移植瘤增长的抑制作用

rhTNF瘤内注射或腹腔注射对人结肠腺癌裸小鼠移植瘤具有抑制作用,结果见表 2

表 2 rhTNF处理后肿瘤重量变化

Tab 2 Effects of rhTNF on weight of transplant tumors

	Weight(g)	Inhibition(%)
Control	2.19± 0.19	-
Low dose	2.2± 0.16	-
Mide dose	1.8± 0.10**##	17.± 3.6**###
High dose	1.52± 0.10**	32.0± 3.7**
Peritoneum	1.82± 0.06**##	17.2± 3.0**###

** : $P < 0.01$ *vs* Control;## : $P < 0.01$ *vs* High dose

2.3 rhTNF处理人结肠腺癌裸小鼠移植瘤的组织学变化

对照组仅见点状、小片状坏死,rhTNF处理组除低剂量组外均出现片状坏死区,坏死范围与剂量相关,中剂量组局灶性坏死多见;高剂量组细胞松散,可见大片状坏死区。坏死瘤细胞多沿血管周围分布,血管结构不清,坏死区有大量炎性细胞浸润,见图 1

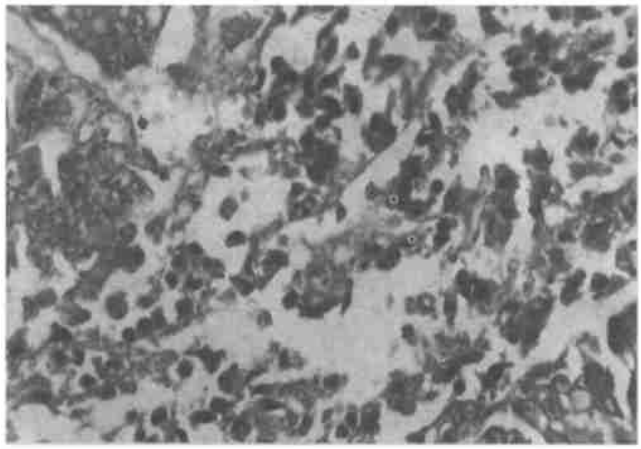


图 1 rhTNF高剂量组,肿瘤组织坏死,坏死区可见大量炎细胞浸润,血管结构不清 (HE× 200)

Fig 1 In high dose group of rhTNF, tumorous tissue necrosed, great number of inflammatory cells invaded, and strucure of blood vessel was neclear (HE× 200)

2.4 rhTNF处理人结肠腺癌裸小鼠移植瘤的超微结构改变

对照组细胞连接紧密,具有人结肠高分化腺癌的超微结构特征,rhTNF治疗组可观察到炎性细胞对肿瘤细胞的攻击相;肿瘤细胞坏死、溶解,髓鞘样结构形成,见图 2 3

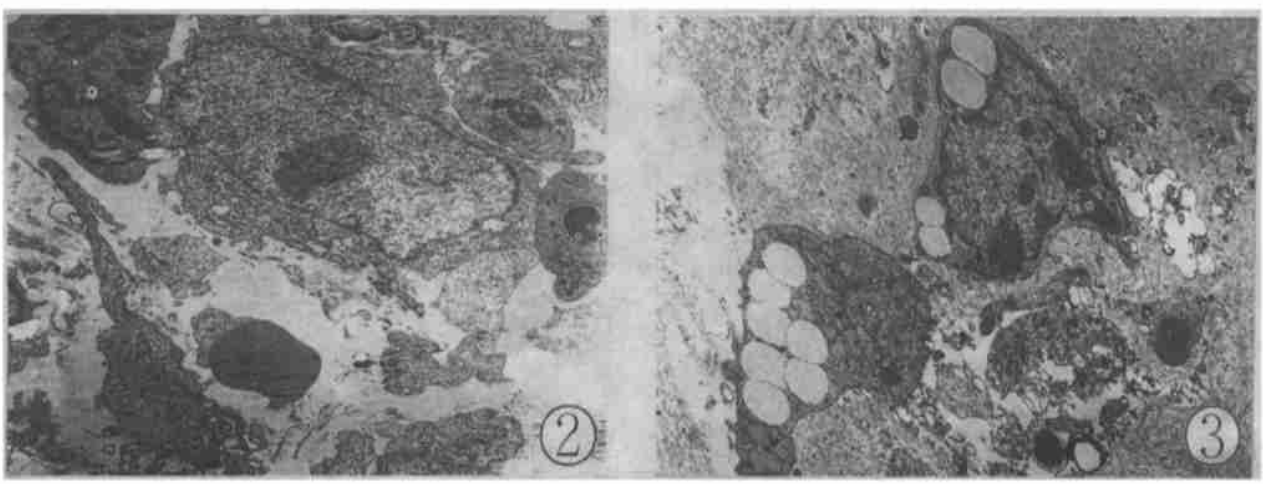


图 2 肿瘤细胞受炎细胞攻击,炎细胞内可见嗜酸性颗粒及溶酶体 (TEM× 4 000)

Fig 2 The tumoaous cells were attacked, acidophil pellets and lysosomes were seen in the inflammatory cells (TEM× 4 000)

图 3 瘤细胞核溶解、坏死,核膜消失,髓鞘样变 (TEM× 5 000)

Fig 3 The tumoaous cell nuclear dissolved and necrosed, cell membrane disappeared and change of similar myelinization was seen (TEM× 5 000)

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

2.5 rhTNF处理人结肠腺癌裸小鼠移植瘤的细胞动力学变化

rhTNF治疗除低剂量组外,中剂量及高剂量组 S+ G_2M期细胞均明显低于对照组,而 G_0/G_1期细胞则高于对照组;增殖指数与对照组相比,高剂量组、中剂量组、腹腔注射组均显著降低($P < 0.01$)。DNA抑制率高剂量、中剂量、腹腔注射组分别为 57.9%、43.7%、43.7%,见表 3

表 3 移植瘤细胞动力学分析

Tab 3 Cytodynamic analyse of transplant tumors

	G_0/G_1	S	G_2/M	PI(%)	DNA inhibition (%)
Control	58.5	15.5	16.1	31.6	-
Low dose	66.2	16.1	17.8	33.9	-
Mide dose	82.2	14.2	3.6	17.8**	43.7##
High dose	86.7	11.1	2.2	13.3**	57.9
Peritoneum	82.2	15.1	2.7	17.8**	43.7#

** : $P < 0.01$ *vs* Control;# : $P < 0.05$,
: $P < 0.01$ *vs* High dose

3 讨论

3.1 rhTNF对大肠癌细胞的抑制作用

肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)是近年来研究较多的一种新型细胞因子,因其具有杀伤多种肿瘤细胞而不损伤正常组织细胞而倍受青睐,是迄今为止所发现的直接杀伤肿瘤作用最强的生物因子之一,许多实验已证实 TNF在体外有杀伤大肠癌细胞的作用。

本实验结果显示,rhTNF在低剂量时,对人结肠癌 SW-480裸小鼠移植瘤没有抑制作用;中高剂量时抑瘤率分别为 18.3%及 33.7%。说明 rhTNF对 SW-480移植瘤呈低度敏感。我们过去体外观察 rhTNF在 500~ 30 000 u/ml时对 SW-480细胞仅有抑制作用,60 000 u/ml 的浓度对 SW-480 细胞的杀伤率才 28%[2],与本实验结果相似。增加剂量可以提高 rhTNF对人结肠腺癌 SW-480移植瘤的抑制率,说明 rhTNF对大肠癌的抑制作用在一定剂量范围内呈剂量依赖性。腹腔给药与瘤内给药疗效有显著性差异,瘤内给药的治疗效果好。Marligit等[3]用 rhTNF经肝动脉插管灌注治疗结肠癌肝转移化疗无效患者,连续用药 15 d,部分患者血浆 CEA水平下降,瘤体缩小,表明 rhTNF局部给药具有一定的抗大肠肿瘤作用,而且局部用药患者对 rhTNF的耐受程度明显高于静脉给药的数倍。结果均提示 rhTNF的瘤内应用是较适宜的给药途径。

3.2 rhTNF抑制大肠癌移植瘤的形态学变化及意义

组织学观察发现 rhTNF作用于移植瘤的形态学变化有两个显著的特点:一是肿瘤细胞坏死区常围绕血管分布,血管有出血、坏死现象;二是肿瘤坏死区有大量的炎性细胞浸润,超微结构可较清晰地观察到淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞对大肠癌细胞的攻击相。提示血管系统的损伤可能是 TNF产生抗肿瘤作用的重要机制之一。

3.3 rhTNF对大肠癌移植瘤作用的细胞动力学变化及其临床意义

细胞动力学测定用于测定肿瘤细胞 DNA相对含量,分析肿瘤细胞周期是一个理想的手段。本实验应用 FCM分析 rhTNF治疗大肠癌移植瘤的细胞动力学变化和 DNA抑制率,旨在阐明 rhTNF在体内对大肠癌细胞核酸代谢的影响。结果表明:rhTNF对大肠癌细胞的 DNA合成有明显的影响,即使中剂量 rhTNF对 DNA抑制率也达 43.7%。进一步对细胞动力学变化进行分析,rhTNF主要抑制大肠癌细胞从 G_0/G_1期向 S期和 G_2M期过渡,致使大肠癌细胞的 S+ G_2M期比例显著低于对照组,而 G_0/G_1期则高于对照组,S+ G_2M期细胞在整个肿瘤细胞周期中的比例即增殖指数(PI)反映的是肿瘤细胞增殖能力,rhTNF作用后,能使肿瘤细胞的增殖能力下降,从而起到抑瘤作用。分析 rhTNF对肿瘤细胞周期及 DNA合成的影响,对临床联合应用化疗药物具有一定指导意义。

参考文献

[1] 张胜本,张连阳 主编.肿瘤化学治疗敏感性与抗药性[M].成都:四川科学技术出版社,1995.91-95.

[2] 张胜本,周晓武,张连阳.重组人肿瘤坏死因子对人结肠癌SW-480细胞在体外杀伤作用的研究[J].第三军医大学学报,1995,17(1):19-23.

[3] Marlight M D, Glora mM, Alexander A, *et al*. Regional Biologic therapy: Hepaticarterial infusion of recombinant human tulmor necrosis factor in patients withliver metastases[J]. Cancer, 1992, 69(2): 557-563

(编辑 陈聪连)

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

Effects of recombinant human TNF on transplanted human colonic carcinoma in nude mice

HUANG Xian-kai, ZHANG Sheng-ben, RAO Ben-qiang (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

Abstract Objective: To study the effects of recombinant human tumor necrosis factor (rhTNF) on transplanted human colonic carcinoma in nude mice. Methods: Human colonic carcinoma cell line SW480 was transplanted to the body of nude mice. The effects of rhTNF on the growth, histomorphology and cytodynamics of the transplanted colonic carcinoma were obsered. Results: rhTNF inhibited the growth of the transplanted colonic carcinoma in a dosage-dependent manner. Partial necrosis of the carcinomatous cells occurred in the surroundings of tumor vessels with the infiltration of large numbers of inflammatory cells in the necrotic foci. rhTNF stopped the cells cycle progress from G_0/G_1 phase to S and G_2M phases and reduced the proliferative index and DNA content of the carcinomatous cells. Conclusion: rhTNF exerts inhibition on the growth of the transplanted human colonic carcinoma possibly through the following mechanisms: ① To induce inflammatory reaction and vascular damage and ② To interfere with the cell cycle.

Key words TNF; colonic carcinoma cell line SW480; colorectal neoplasm; nude mouse

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(39270656)

文章编号: 1000-5404(1999)11-0795-01

特别巨大左心房 1例

A case report of especially large left atrium

郝 嘉,肖颖彬,王学峰 (第三军医大学附属新桥医院心血管外科,重庆 400037)

在 1998年我院开展的 314例体外循环手术中,发现巨大左心房共有 11例,其中 1例特别巨大是我科历年手术病例中最大者,现报告如下。

1 临床资料

患者彭贤刚,男,26岁,因"劳力性心悸、气促 9年"于 1998年 11月 23日入院。患者入院前曾出现咯血、下肢水肿 1次。入院查体: 一般情况好,双肺呼吸音清晰,未闻及干、湿性罗音。心前区明显隆起,心尖搏动在第 6肋间左锁骨中线外 4 cm,剑突下可见明显搏动。心尖部可触及抬举样冲动,未触及细震颤。心率 82次/min,律绝对不齐,心音强弱绝对不等。心尖部可闻及Ⅲ/6级收缩期吹风样杂音。周围血管征阴性。胸片示: 心脏呈球形增大,心胸比为 0.8 食管Ⅲ°压迹。心前、后间隙消失。B超示: 风心病:① 巨大左房(前后径 125 mm,横径 148 mm,伸至左室后壁约 4.86 cm),左室明显增大(前后径 31 mm),右房明显增大(横径为 54 mm)。② 二尖瓣重度返流(返流面积为 30.27 cm^2),主动脉瓣轻度返流,三尖瓣轻至中度返流。③ 继发性肺动脉高压。肺功能检查示: 混合性通气功能障碍,肺容量各值、肺弥散功能和小气道功能均显著下降。其余各项化验检查无异常。经静滴心肌极化液等治疗后于 12月 4日在全麻体外循环心脏不停跳下行二尖瓣置换、左房折叠、三尖瓣环缩成形术。换27#进口 C-M双叶机械瓣,折叠左房顶部及底部,三尖瓣前、隔瓣交界环缩成形,预置起博导线,置胸腔、心包引流管。(术中机器转流 105 min,阻断上、下腔静脉 64 min)。术后 19 h拔除气管插管,分别于 12月 7日和 12月 10日拔除心包和胸腔引流,复查胸透未见胸腔积液,查体心前区未闻及杂音。于 12月 15日出院,至今一般情况良好。

2 讨论

巨大左房导致不同程度的功能障碍,术后并发症较多,右房内径与左心房附壁血栓、脑栓塞、心房纤颤、心力衰竭的发生率明显相关[1]。此类病人必须行左房折叠术,因其左房壁极薄,缝合时注意勿缝穿全层,否则很难处置[2]。术中、术后心肌保护十分重要,我们采用心脏不停跳体外循环手术后认为心肌保护效果很好。另外,此类病人应适当延处呼吸机支持的时间。

关键词 巨大左心房;手术治疗

中图法分类号 R605 文献标识码 B

参考文献

[1] 陈世蓉,高祖玲.风湿性心脏病二尖瓣狭窄巨大左心房的临床意义[M].重庆医学, 1998, 27(5): 298-299.

[2] 汤洪升.瓣膜置换术中巨大左心房的处理[J].浙江医科大学学报, 1992, 5 222-223.

作者简介: 郝 嘉,男, 26岁,住院医师,硕士

收稿日期: 1999-05-28;修回日期: 1999-10-15

(编辑 冷怀明)

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