DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.018

区域性缺血对裸小鼠胰腺移植癌抑制作用的研究

郑树国* 何振平 段恒春 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆,400038

提 要 目的:为缺血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小鼠胰腺原位移植瘤模型的基础上,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诱导胰腺右叶区域性缺血,观察缺血对裸小鼠胰腺移植癌群体增殖动力学及细胞周期动力学的影响。结果:缺血组移植癌生长缓慢,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:区域性缺血能有效地抑制裸小鼠胰腺移植癌的生长,并抑制癌细胞DNA及蛋白质的合成。

关键词 缺血疗法;胰腺肿瘤;增殖动力学;裸小鼠

中图法分类号 R364.12;R735.9

本研究在建立人胰腺癌细胞株裸小鼠胰腺原位移植瘤模型的基础上,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诱导胰腺右叶区域性缺血,观察缺血对裸小鼠胰腺移植癌增殖动力学的影响,为缺血疗法[1,2]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、模型建立及试验分组

人胰腺癌细胞株PC-3引自北京协和医院病理科[3],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RPMI1640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。人胰腺癌裸小鼠胰腺原位移植瘤模型的建立采用Marincola法[4]:取指数生长期PC-3细胞,0.25%胰酶消化脱壁,离心、去上清,以RPMI1640液稀释,0.04%台盼蓝染色细胞计数,调整细胞浓度为$10\times10^6\cdot ml^{-1}$,裸小鼠以0.1%戊巴比妥钠35 $mg\cdot kg^{-1}$腹腔注射麻醉,无菌条件下开腹,将RPMI1640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。

本研究共用裸小鼠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只裸小鼠中有30只长出肿瘤,作为研究对象,并随机分为两组:①缺血组($n=15$):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,余步骤同缺血组。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-Ⅰ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$V=\pi/6\cdot LWH$计算移植癌体积(V),按各时相点移植癌大小分别描记缺血组对照组移植癌的生长曲线,并根据公式$TD=0.1\ T/Log\ DT-LogDO$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 移植癌细胞周期及蛋白质含量测定 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。

1.2.5 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

缺血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($P<0.01$)。

2.2 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,缺血组移植癌生长缓慢,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1。

2.3 移植癌细胞周期及蛋白质含量

缺血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2。

* 郑树国,男,34岁,主治医师,博士研究生

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

表 1 各组移植癌体积(mm^3)及倍增时间(d)($n=5$)

Tab 1 Volume (mm^3) and time (d) of volume doubling in different groups ($n=5$)

Group	Post-operation time (d)				Times of volume doubling
	0	3	7	14	
Control	67.72±6.13	93.43±9.33	308.77±31.44	912.27±76.40	3.69±0.22
Ischemia	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 2 移植癌细胞增殖指数及蛋白含量(荧光道值)变化($n=5$)

Tab 2 Changes of proliferative index and protein content in the transplanted cancer ($n=5$)

Group	Post-operation time (d)		
	3	7	14
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
Ischemia			
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

2.4 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;缺血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,出现纤维化及淋巴细胞浸润。

3 讨论

本研究成功地将人胰腺癌细胞株 PC-3 移植于裸小鼠胰腺右叶,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。血流量测定结果显示缺血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所诱导的胰腺右叶区域性缺血效应至少持续 14 d,且移植癌的缺血程度较癌周胰腺组织更为严重,表明该模型用于缺血疗法对胰腺癌作用的研究较人胰腺癌裸小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。

本研究发现,对照组移植癌体积增长迅速,呈指数生长趋势,缺血组移植癌生长缓慢,和对照组比移植癌体积显著缩小,倍增时间延长,提示区域性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,结果显示缺血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。有报道胰的各动脉分支在胰腺实质内形成纵横交错的立体网络吻合,结扎或栓塞一支或两支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]。本研究发现缺血组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

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

血性胰腺炎的组织病理学特征，与 Tanaka 等[7]的报道相仿。我们在后期的临床应用中亦发现胰周动脉结扎安全可行，无坏死性胰腺炎等严重并发症发生[8]。

缺血疗法能否有效的应用于临床胰腺癌的治疗主要取决于两个因素：①胰腺癌对缺血治疗的敏感性，即在缺血状态下癌的生长是否能得到有效的控制；②区域性胰腺缺血是否会导致急性坏死性胰腺炎等严重并发症。本研究结果表明区域性缺血能有效地抑制裸小鼠胰腺移植癌的生长及增殖，从机制上模拟了缺血疗法对临床胰腺癌的作用过程。病理形态学检查发现癌周胰腺组织无出血及坏死性炎症改变。由此推论，缺血疗法在中晚期胰腺癌的治疗中安全可行，在控制癌肿生长，缓解症状及力争缩小后二期切除等方面具有重要的作用。

参考文献

1 李　荣. 癌细胞的断血疗法. 日本医学介绍，1994，15(6)：271

2 郑树国，何振平. 胰腺癌的缺血治疗. 国外医学：外科学分册，1997，24(4)：204

3 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. 基础医学与临床，1992，12(6)：50

4 Marincola F M, Drücker B J, Siao D Y, *et al*. The nude mouse as a model for study of human pancreatic cancer. J Surg Res, 1989, 47(7): 502

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

6 Shimamura Y, Gunven P, Ishij M, *et al*. Temporary redistribution of hepatic or pancreatic blood flow by vascular occluders during intra-arterial chemotherapy for carcinoma of the liver and pancreas. Surg Gynecol Obstet, 1993, 177(11): 617

7 Tanaka T, Ichiba Y, Miura Y, *et al*. Canine model of chronic pancreatitis due to chronic ischemia. Digestion, 1994, 55(2): 86

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. 肝胆外科杂志，1999，7(1)：23

（收稿：1998-12-15；修回：1999-04-23）

（编辑　陈聪连）

Inhibitory effects of regional ischemia on transplanted pancreatic cancer in nude mice

Zheng Shuguo, He Zhenping, Duan Hengchun (Hepatobiliary Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To provide experimental data for the clinical application of ischemia therapy in treatment of pancreatic cancer. Methods: After the model of transplanted pancreatic cancer was established in nude mice with orthotransplantation of human pancreatic cancer cell line into the pancreas, the ischemia of the right lobe of the pancreas was induced with ligation of the gastroduodenal, inferior pancreaticoduodenal and dorsal pancreatic arteries. The effects of the regional ischemia on the population proliferative and cytocycle kinetics on the pancreatic transplanted cancer were investigated. Results: The transplanted cancer grew slower and its doubling time was longer in the ischemic group than in the control. On the 3rd, 7th and 14th day after operation, the size of transplanted cancer, the proliferative index and protein content of the cancer cells were significantly lower in the ischemic group than in the control ($P<0.01$). Conclusion: Regional ischemia can effectively inhibit the growth of transplanted pancreatic cancer in nude mice and suppress the synthesis of DNA and protein in the cancer cells.

Key words ischemia therapy; pancreatic neoplasm; proliferative kinetics; nude mouse

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