

文章编号:1005-6947(2008)08-0781-04

· 基础研究 ·

# TNF- $\alpha$ 在实验性胰腺癌模型发生发展中的作用

柳兴其<sup>1</sup>, 杨竹林<sup>2</sup>, 邓星辉<sup>2</sup>, 李清龙<sup>2</sup>

(中南大学湘雅二医院 1. 检验科 2. 肝胆胰外科研究室, 湖南 长沙 410011)

**摘要:**目的 研究实验性胰腺癌发生过程中血清 AMS 和 TNF- $\alpha$  含量的变化及其意义。方法 将二甲基苯并蒽 (DMBA) 直接置入 SD 大鼠胰腺被膜下实质内建立胰腺癌模型组 (A) 组, 在制模过程中每周腹腔注射曲古霉素 (TSA) 定为干预组 (B) 组, A, B 组于 3~5 个月内处死。手术对照组 (C 组) 除未置入 DMBA 外, 余同 A 组, 于第 5 个月处死。肉眼检查及 HE 染色观察胰腺癌发生情况。血清 AMS 含量由全自动生化分析仪测定, TNF- $\alpha$  含量由 ELISA 法测定。结果 (1) A 组 3~5 个月癌发生率为 48.7% (18/37), 17 例为胰腺导管癌, 1 例为纤维肉瘤。B 组 5 个月癌发生率为 33.3% (12/36); 11 例为胰腺导管癌, 1 例为纤维肉瘤; A 组胰腺癌最大径均值大于 B 组 ( $P < 0.05$ ); C 组胰腺及 A, B 组胰腺外主要脏器均无明显病理改变。(2) A, B 组大鼠血清 AMS 和 TNF- $\alpha$  含量明显高于 C 组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 但 A 组和 B 组之间差异无显著性 ( $P < 0.05$ )。A, B 组中的胰腺癌组和非癌胰腺组大鼠血清 AMS 和 TNF- $\alpha$  含量均明显高于 C 组 ( $P < 0.05$ ), 但胰腺癌亚组和非癌胰腺亚组间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。结论 较大剂量 DMBA 置入胰实质内, 可在短期内获得较高胰腺癌发生率, TSA 能干预胰腺癌的生长; 在胰腺癌发生过程中血清 AMS 和 TNF- $\alpha$  含量有明显升高, TNF- $\alpha$  可能在胰腺癌发生中发挥作用。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(8): 781-784]

**关键词:** 胰腺肿瘤; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 淀粉酶; 疾病模型, 动物; 大鼠

中图分类号: R 735.9

文献标识码: A

## The role of TNF- $\alpha$ in the establishment and development of model of pancreatic cancer

LIU Xingqi<sup>1</sup>, YANG Zhulin<sup>2</sup>, DENG Xinghui<sup>2</sup>, LI Qinglong<sup>2</sup>

(1. Department. of Laboratory Medicine 2. Research Laboratory of Hepatobiliary Diseases, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract: Objective** To establish a model of pancreatic cancer (PC) in SD rats, and to study the changes of serum levels of AMS and TNF- $\alpha$  and the significances. **Methods** Dimethylbenzanthracene (DMBA) was directly implanted into pancreatic parenchyma of SD rats (experimental group, group A), and in the process of establishing PC, weekly TSA by 1P was done in intervention group (group B). The tumor development of rats executed within 3~5 months in Group A and Group B were observed by HE staining and gross examination. Meanwhile, the rats in the sham operation group (Group C) were executed at 5 months. The levels of serum AMS were detected by autobiochemical assay apparatus, and the levels of serum TNF- $\alpha$  were determined by ELISA. **Results** (1) The incidence of pancreatic cancer in Group A within 3~5 months was 48.7% (18/37), including 17 cases of pancreatic ductal adenocarcinoma and 1 case of fibrosarcoma. The incidence of pancreatic cancer in Group B was 33.3% (12/36), including 11 pancreatic ductal adenocarcinoma and 1 case of fibrosarcoma. The maximal diameter of tumor mass in Group A was higher than that in Group B ( $P < 0.05$ ). No pathological changes were found in pancreas of Group C and in other main

收稿日期: 2008-07-11; 修订日期: 2008-08-04。

作者简介: 柳兴其, 男, 中南大学湘雅二医院主管技师, 主要从事医学检验的临床与实验研究工作方面的研究。

通讯作者: 杨竹林 E-mail: yangzhuling8@sina.com

organs of Group A and Group B. (2) The serum levels of AMS and TNF- $\alpha$  were significantly higher in Group A and Group B than those in Group C ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The serum levels of AMS and TNF- $\alpha$  were significantly higher in pancreatic cancer rats and non-cancerous rats of Group A and Group B than those in Group C ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** A large dose of DMBA directly implanted into the parenchyma of pancreas can induce an ideal pancreatic cancer model with high incidence of occurrence in a short time. TSA may have an inhibitive effect on the carcinogenesis and growth of pancreatic cancer in rats. The serum levels of AMS and TNF- $\alpha$  are significantly increased in the process of carcinogenesis, and TNF- $\alpha$  might have an effect on carcinogenesis of pancreatic cancer in rats.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(8):781-784 ]

**Key words:** Pancreatic Neoplasms; TNF- $\alpha$ ; AMS; Disease Models, Animal; Rats

**CLC number:** R 735.9

**Document code:** A

研究发现,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )在一些恶性肿瘤发生发展过程中有较重要的作用<sup>[1-5]</sup>,但在胰腺导管癌发生发展中的作用仍不甚明了。血清淀粉酶(AMS)是反映急性胰腺炎病变程度的重要指标,在胰腺导管癌发生发展过程中也存在质和量的改变(6),笔者应用二甲基苯并蒽(dimethylbenzanthracene, DMBA)直接置入 Sparague-Dawley (SD)大鼠胰实质内建立胰腺癌模型,应用曲古霉素A(trichostation A, TSA)腹腔注射设立干预组,在此基础上探讨血清AMS和TNF- $\alpha$ 含量的变化,并探讨TSA的抑瘤作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型的建立及分组

选择90只SD大鼠,雌雄不限,体质量150~200g(中南大学湘雅二医院实验动物中心提供),随机分成3组:胰腺癌模型组(A组)40只,胰腺癌TSA干预组(B组)40只,手术对照组(C组)10只。术前禁食24h,不禁水,2%戊巴妥钠腹腔内注入麻醉。经上腹正中切口2cm进腹,暴露胰腺后,于体尾部切开胰腺被膜及部分胰实质(深1mm)。A、B组各置入9mg DMBA,缝合胰腺被膜,关腹后在普通环境中喂养。B组术后第1天开始每周腹腔注射1 $\mu$ g/mL TSA 1 mL,除自然死亡外,分别于3,4,5个月随机处死A组(7,10和20只)和B组(6,10和20只)大鼠。C组除未置入DMBA外,余同A组,术后5个月处死。

### 1.2 肉眼及组织病理形态学观察

A、B组鼠处死后肉眼观察胰腺及肝、胆囊、胆总管、胃、肠、肺等主要脏器的病理改变,然后取全胰腺组织及部分肝、胆囊、胆总管、胃、肠、肺组织置入4%甲醛溶液固定16~18h,常规制作石蜡包埋切片,常规HE染色,光镜下观察各脏器病理学改变。

### 1.3 血清AMS和TNF- $\alpha$ 测定

抽取处死大鼠心脏血液置抗凝管(EP管)中,4 $^{\circ}$ C离心,3500 r/min共15 min,分离血浆;血清置EP管中,置液氮保存备用。血清AMS含量由本院检验科日立全自动生化分析仪测定。TNF- $\alpha$ 含量由酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定(购自武汉博士德公司),严格按说明书操作,步骤略。

### 1.4 统计学处理

将所得数据输入SPSS13.0统计软件包行 $\chi^2$ 检验, Fisher精确概率法及 $t$ 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 肉眼所见

A组发癌率高于B组(48.7%:33.3%,  $P > 0.05$ )。A、B组各有1例纤维肉瘤发生肝转移和网膜脂肪组织转移。A组胰腺肿瘤最大径7例为0.5~1.0 cm,10例为1.0~2.0 cm和1例 $> 2.0$  cm; B组胰腺肿块最大径9例为0.5~1.0 cm,2例为1.0~2.0 cm和1例 $> 2.0$  cm。A组肿块最大径大于B组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表1)。A、B组胰腺外主要脏器及C组胰腺均未见明显的肉眼形态学改变。

表1 两组大鼠胰腺肿瘤发生率[例数比(%)]

组别	<i>n</i>	3个月	4个月	5个月	总发癌例数
A	37	2/7(28.6)	4/10(40.0)	12/20(60.0)	18/37(48.7)
B	36	1/6(16.7)	3/10(30.0)	8/20(40.0)	12/36(33.3)

### 2.2 镜下所见

A、B组胰腺肿瘤组织学观察结果显示为胰腺管腺癌,1例为纤维肉瘤(表2)(图1-2)。A组和B组未形成肿瘤的大鼠胰腺及形成肿瘤的大鼠

胰腺癌旁组织小叶间导管上皮细胞均呈增生和不典型增生等病理学改变(图3),其中A组非癌胰腺中导管上皮细胞呈中至重度不典型增生10例(10/19,52.6%),B组非癌胰腺中导管上皮细胞中呈中至重度不典型增生8例(8/24,33.3%),两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。A、B组胰腺外主要脏器及C组胰腺均未见明显的镜下病理形态学改变。

### 2.3 各组血清AMS和TNF- $\alpha$ 含量比较

A、B组大鼠血清AMS和TNF- $\alpha$ 含量均明显高于C组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),A、B组之间差异无显著性( $P > 0.05$ )(表3)。此外的胰腺导管癌亚组(A组+B组)和非癌胰腺亚(A组+B组)组血清AMS和TNF- $\alpha$ 含量也明显高于C组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),但胰腺癌组与非癌胰腺组之间差异均无显著性(表4)。血清TMS和TNF- $\alpha$ 含量与肿块大小、病理类型、分化程度、及喂养时间均无明显关系各病理参数分组间差异无显著性( $P > 0.05$ )(表5)。

表2 两组胰腺肿块病理形态学类型(例数)

组别	n	纤维肉瘤	胰腺导管癌		
			高分化	中分化	低分化
A	18	1	6	7	4
B	12	1	6	4	1
P值			>0.05		

表3 血清AMS和TNF- $\alpha$ 含量在不同组别中的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AMS	TNF- $\alpha$
C	10	133.99 $\pm$ 138.70	102.80 $\pm$ 20.90
A	37	298.24 $\pm$ 149.88 <sup>1)</sup>	244.56 $\pm$ 182.63 <sup>2)</sup>
B	36	255.72 $\pm$ 134.62 <sup>2)</sup>	218.74 $\pm$ 163.55 <sup>2)</sup>

注:1)与C组比较, $P < 0.01$ ,2) $P < 0.05$ ,与C组比较;

表4 不同病理类型组别血清AMS和TNF- $\alpha$ 含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AMS	TNF- $\alpha$
C常	10	133.99 $\pm$ 138.70	102.80 $\pm$ 20.90
胰腺癌亚组	30	288.76 $\pm$ 144.58 <sup>1)</sup>	263.42 $\pm$ 186.35 <sup>2)</sup>
非癌胰腺亚组	43	268.84 $\pm$ 139.75 <sup>2)</sup>	208.35 $\pm$ 164.67 <sup>2)</sup>

注:1)与C组比较, $P < 0.01$ ,2)与C组比较, $P < 0.05$

表5 胰腺肿瘤不同病理参数中血清AMS和TNF- $\alpha$ 含量的变化

病理参数	例数	AMS含量	t值	P值	TNF- $\alpha$ 含量	t值	P值
肿块大小							
$\leq 1.0$ cm	16	258.32 $\pm$ 138.58	1.42	>0.05	232.75 $\pm$ 178.43	1.68	>0.05
>1.0 cm	14	323.58 $\pm$ 154.62			298.46 $\pm$ 188.68		
病理类型							
导管腺癌	28	287.22 $\pm$ 148.64	0.08	>0.05	259.84 $\pm$ 178.51	0.24	>0.05
纤维肉瘤	2	314.59 $\pm$ 123.14			303.54 $\pm$ 126.62		
导管腺癌分化程度							
高分化	12	269.62 $\pm$ 141.68	3.84	>0.05	238.52 $\pm$ 172.46	4.52	>0.05
中分化	11	282.84 $\pm$ 152.62			254.58 $\pm$ 182.37		
低分化	5	346.55 $\pm$ 162.43			338.22 $\pm$ 184.62		
喂养时间							
3个月	3	215.43 $\pm$ 164.58	4.32	>0.05	218.58 $\pm$ 180.21	5.68	>0.05
4个月	7	265.52 $\pm$ 155.66			234.47 $\pm$ 188.45		
5个月	20	307.62 $\pm$ 128.69			279.34 $\pm$ 178.46		

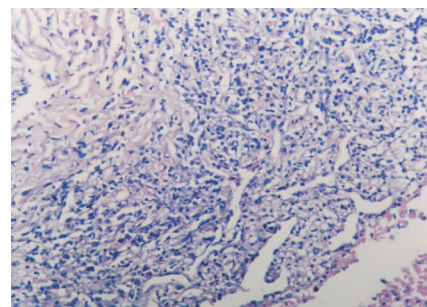


图1 低分化腺癌(A组)(HE  $\times$  200)

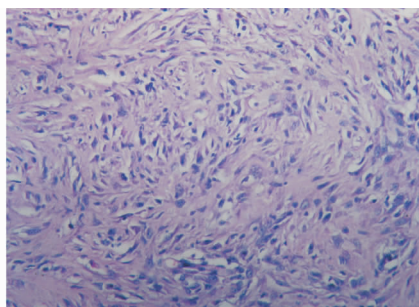


图2 纤维肉瘤(B组)(HE  $\times$  200)

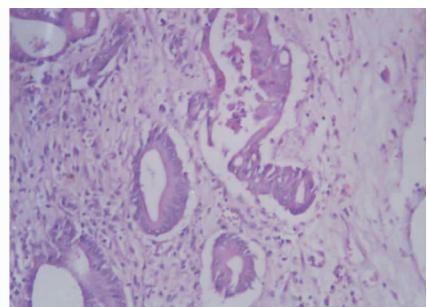


图3 胰腺导管重度不典型增生(B组)(HE  $\times$  200)

### 3 讨论

目前复制胰腺癌模型的实验方法较多,包括啮齿动物和犬类直接暴露于致癌物、激活转基因鼠的癌基因表达及移植异体胰腺癌组织至裸鼠等。Rivera 等采用 DMBA 直接置入胰腺被膜下的实质内诱发胰腺导管癌,SD 大鼠 10 个月内发癌率为 39%。此后,国内外学者进行了相似的研究<sup>[7-11]</sup>。体内外实验证实 TSA 能抑制多种肿瘤的发生并通过抑制肿瘤血管生成及改变肿瘤微环境而影响肿瘤的进展<sup>[12]</sup>。

笔者应用较大剂量 DMBA (9 mg) 直接置入 SD 大鼠胰腺组织内,5 个月内 A 组发癌率为 48.7%,B 组发癌率为 33.3%;病理学类型除 2 例纤维肉瘤外,均与人类胰腺导管腺癌结构相同。A 组发癌率高于 B 组,但差异无显著性 ( $P > 0.05$ );A、B 两组发癌率随喂养月份的延长而增加,但差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。B 组肿块最大径明显低于 A 组 ( $P < 0.05$ );两组大鼠除纤维肉瘤分别发生肝转移和脂肪网膜组织转移外,均未见胰腺外主要脏器发生肿瘤以及其他病理改变。综观胰腺癌模型近年研究的进展<sup>[7-11]</sup>,笔者参照报道制作的胰腺癌 SD 大鼠模型具有以下优点:(1)成瘤周期短、致癌率高;(2)能在短期内观察到胰腺癌发生发展的病变过程;(3)组织学特征更接近于人类胰腺导管癌;(4)胰腺外其他脏器均未有恶性肿瘤出现;(5)虽不能明显降低胰腺癌的发生率,但可能是与剂量有关。TSA 抑制胰腺癌的生长速度;(6)制作成本低廉。

血清 AMS 含量是诊断急性胰腺炎病变程度的重要生化指标,也是诊断胰腺恶性肿瘤的一个辅助指标之一,胰腺癌患者血清 AMS 含量可持续升高,但其值可低于急性胰腺炎<sup>[6]</sup>。本组资料显示 A、B 组血清 AMS 值明显高于 C 组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),但 A 组和 B 组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ );胰腺癌亚组和非癌胰腺亚组血清 AMS 含量明显高于 C 组, ( $P < 0.05$ ),但两组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。提示在 DMBA 诱癌过程中伴随胰腺的损伤和血清 AMS 升高。

研究表明外源性 TNF- $\alpha$  能诱导肿瘤细胞凋亡,具有炎症介质和免疫调节等多种生物学功能,并对肿瘤细胞有细胞毒作用。近年研究发现 TNF- $\alpha$  在多种恶性肿瘤患者血清中显著升高,且

与肿瘤的发生,进展及预后有一定关系<sup>[1-5]</sup>。然而对于肿瘤组织中内源性 TNF- $\alpha$  的自分泌及其作用研究极少<sup>[4]</sup>。本组资料显示 A、B 组血清 TNF- $\alpha$  含量明显高于 C 组 ( $P < 0.05$ ),但 A、B 组鼠之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ );胰腺癌亚组和非癌胰腺亚组血清 TNF- $\alpha$  含量明显高于 C 组 ( $P < 0.05$ ),但两亚组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。上述结果提示,在 DMBA 诱癌过程中伴随着血清 TNF- $\alpha$  含量升高;TNF- $\alpha$  可能在 SD 大鼠胰腺癌发生发展过程中有较重要作用,但其作用机制有待深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Ariapart P, Berqstedt - Lindquist S, van Harmelen V, *et al.* Resection of pancreatic cancer normalizes the preoperative increase of tumor necrosis factor alpha gene expression [J]. *Pancreatol*, 2002, 2 (5): 491 - 494.
- [2] Friess H, Guo XZ, Nan BC, *et al.* Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1999, 880 (1): 110 - 121.
- [3] 马洪,宋宇峰,杨建斌,等. 肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  在口腔鳞癌中的表达及临床意义 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2007, 23 (1): 75 - 77.
- [4] 贾友鹏,巩鹏,王忠裕,等. TNF-A 及其受体 1 在胆管癌和先天性胆总管胰囊性扩张症中的表达及意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16 (2): 180 - 182.
- [5] 曹杰,陈孝术,核因子 - Kappa B 与肿瘤坏死因子 amRNA 在肝癌中的表达及意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16 (3): 232 - 235.
- [6] 庄会峰,刘名霞,侯素君,等. 胰腺癌患者检测 TSGF、CA19 - 9、CA242、AMS 及 LPS 的临床意义 [J]. *医学检验与临床*, 2006, 17 (4): 31 - 32.
- [7] Rivera JA, Graeme - cock F, Werner J, *et al.* Rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma. Targeting chemical carcinogens [J]. *Surgery*, 1997, 122 (1): 82 - 90.
- [8] Bochaman DE, Guo J, Buchler P, *et al.* Origin and development of the precursor lesions in experimental pancreatic cancer in rats [J]. *Lab Invest*, 2003, 83 (6): 853 - 859.
- [9] 秦仁义,爱德,邹声泉,等. 一种新型大鼠胰腺癌模型的制备 [J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17 (5): 462 - 463.
- [10] 夏佳,田锐,秦仁义,大鼠胰腺癌吉西他滨耐药细胞系 RPC/GEM 的建立 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16 (10): 955 - 959.
- [11] Kimura K, Satoh K, Kann A, *et al.* Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experigenesis of experineatal pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice. *Cancer Sci*, 2007, 98 (2): 155 - 162.
- [12] Monnert C. Histone deacetylase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2005, 40 (1): 1 - 13.