

肝癌切除术后转移过程中炎性递质的作用

白莉, 毛高平, 曹传平, 张映辉

白莉, 毛高平, 曹传平, 张映辉, 中国人民解放军空军总医院 北京市 100036
白莉, 女, 河北人, 汉族, 1996年北京协和医科大学肿瘤医院博士毕业, 主任医师, 主要从事肝癌的基础与临床研究.

通讯作者: 白莉, 100036, 北京市海淀区阜成路 30 号, 中国人民解放军空军总医院消化内科. bai_li@hotmail.com
电话: 010-66986729-6231

收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

Effects of inflammatory cytokines on metastasis of liver cancer after apparently curative operation

Li Bai, Gao-Ping Mao, Chuan-Ping Cao, Ying-Hui Zhang

Li Bai, Gao-Ping Mao, Chuan-Ping Cao, Ying-Hui Zhang, Department of Digestive Diseases, General Air Force Hospital, Beijing 100036, China
Correspondence to: Dr. Li Bai, Department of Digestive Diseases, General Air Force Hospital, 30 Fucheng Road, Beijing 100036, China. bai_li@hotmail.com

Received: 2005-04-15 Accepted: 2005-05-14

Abstract

AIM: To explore the effects of relevant inflammatory cytokines on the metastasis of liver cancer after apparently curative operation.

METHODS: A mouse model for metastasis of experimental liver cancer was established by inoculation of hepatoma 22 (H₂₂) cells into subserous layer of spleen. Partial hepatectomy (PH) or sham operation (SH) was performed at various periods of spleen inoculation, and metastasis was observed at the 11th day. The expression levels of inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The metastatic tumors were significantly increased in PH mice as compared with those in SH mice (stage IV: 16/40 vs 4/38, $P = 0.00\ 087$) and the mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and VCAM-1 were markedly higher. The peak of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and VCAM-1 expression were observed 96, 72, 48 and 72 hours after inoculation, respectively. Among them, TNF- α expression was found rapidly increased 4 hours after PH, and then linearly increased till 96 hours. The concentrations of IL-1 β and IL-6 fell quickly to normal level after peaks. The peak expression of VCAM-1 appeared twice (at 4 and 72 h)

after PH, which was 3-6 times higher than normal level.

CONCLUSION: The levels of inflammatory cytokines, especially TNF- α , are positively related to the metastasis, and they may promote the metastasis of liver cancer.

Key Words: Liver cancer; Metastasis; Inflammatory cytokines; Partial hepatectomy

Bai L, Mao GP, Cao CP, Zhang YH. Effects of inflammatory cytokines on metastasis of liver cancer after apparently curative operation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1507-1509

摘要

目的: 探讨炎性细胞因子在肝癌术后复发过程中的影响.

方法: 615 小鼠脾包膜下接种肝癌 H₂₂ 腹水瘤细胞, 同时进行 2/3 肝切除 (PH) 或假手术 (Sham), 术后不同时间采集肝脏标本提取 mRNA, 测定肝组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 VCAM-1 的表达水平. 为观测肝内肿瘤转移程度, 动物被饲养 11 d, 断颈处死, 计数肝脏表面瘤结节数量.

结果: PH 组与假手术组比较, 接受肝切除的动物肝内转移瘤明显增多, 两组间比较具有显著性差异 ($P = 0.00\ 087$). 肝组织内 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 VCAM-1 mRNA 的表达明显增高, 其峰值分别在 96、72、48 和 72 h. 其中 TNF- α mRNA 在 PH 后 4 h 迅速升高, 在术后 4 d 内升高呈线性关系. IL-1 β 在术后 72 h 达到峰值后迅速降至正常水平. IL-6 mRNA 表达的峰值时间为 PH 后 48 h, 下降至正常水平的时间也较迅速. VCAM-1 mRNA 的表达在正常组织含量甚微, 几乎观测不到, 但在术后升高有两个峰值, 分别为 4 和 72 h, 可达到正常水平 3-6 倍.

结论: 炎性细胞因子, 尤其是 TNF- α 的表达与转移瘤有明显的正相关, 可能对肿瘤转移有一定的增强效果.

关键词: 肝癌; 转移; 炎性细胞因子; 肝部分切除

白莉, 毛高平, 曹传平, 张映辉. 肝癌切除术后转移过程中炎性递质的作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1507-1509
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1507.asp>

0 引言

原发性肝癌 (PHC) 手术切除术后高的复发率直接影响其治疗效果. 如肿瘤 < 3 cm 的肿瘤, 手术后 5 a 生存率仅为 66.3%, 即使是 < 5 cm 的肝癌患者接受肝移植

后, 5 a 生存率也仅为 63%^[1-2]. 积极预防和减少肝癌手术切除后和肝移植后的复发, 才能从根本上提高肝癌的治愈水平. 下面从炎性细胞因子对肝部分切除术后肿瘤复发转移的影响角度进行研究.

1 材料和方法

1.1 材料 615 小鼠, 18-22 g, 雌雄各半(预防医学科学院实验动物中心). H₂₂肝癌腹水瘤细胞(中国医学科学院病理系). 鼠白血病病毒逆转录酶(MMLV), 脱氧核糖核苷三磷酸(4dNTP)及TaqDNA聚合酶(GIBCO, 北方同正公司); RNA酶抑制物(RNasin 华美公司); 六核苷酸随机引物(Oligo(dT) 华美公司); 印度墨汁(北京化学试剂公司). 引物序列 TNF- α (349 bp) Sense 5'-TTCTGTCCCTTTCACTCACTGG-3', Antisense 5'-TTGGTGGT TTGCTACGACGTGG-3', IL-1 β (441 bp) Sense 5'-ATTA GACAGCTGCACTACAGGCTC-3', Antisense 5'-AGATTCCA TGGTGAAGTACCTTAT-3', IL-6 (156 bp) Sense 5'-TGGA GTCACAGAAGGAGTGGCTAAG-3', Antisense -TCTGACCA CAGTGAGGAATGTCCAC-3', 和 VCAM-1 (139bp) Sense 5'-CCTCACTTGACGCACTACGGGCT-3', Antisense 5'-TTTTCC AATATCCTCAATGACGGG-3', β -actin (478bp) Sense 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACATCAAA-3', Antisense 5'-ACTCATCGTACTCTGCTTGCTGA-3', β 2-MG (300bp) Sense 5'-GGCTCGCTCGGTGACCCTAGCTTT-3', Antisense 5'-TCTGCAGGCGTATGTATCAGTCTCA-3'. MPIAS-500多媒体彩色病理图文分析系统(同济医科大学清平影像公司); 紫外分光光度仪(日本岛津); 9600基因扩增仪(美国); DYY-III电泳仪(北京六一仪器厂); Molecular Analyst (Bio-Rad, 美国).

1.2 方法 雌性 615 小鼠, 注射 H₂₂ 肝癌腹水瘤细胞 1×10^6 入动物脾被膜下制备肝转移动物模型^[3]. 动物在乙醚麻醉下腹部正中行纵形切口, 切除肝右叶占全肝重量的 2/3 肝组织, 假手术组过程同样, 但无半肝切除. 在手术后 4, 16, 24, 48, 72 和 96 h 采集肝脏标本. 采用 Trizol 试剂盒提取肝组织内 mRNA, 经鼠白血病病毒逆转录酶合成 cDNA, 分别在 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 VCAM-1 的引物引导下合成相应的 PCR 产物, 经 2% 琼脂糖电泳分离, Molecular Analyst 定量分析.

统计学处理 各组计量数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用 SPSS 统计软件进行组间显著性分析和非参数对比分析.

2 结果

2.1 半肝切除动物的实验性肝转移比较 转移瘤定级标准^[3]. 0 级: 无转移. I 级: 在肝的一个叶内有 1-2 个小转移灶, 直径 0.2-0.5 mm. II 级: 肝内有 3-5 个小转

移灶或 1-2 个较大转移灶, 直径 0.5-1 mm. III 级: 肝内转移灶 >1 mm, 但 <1 cm, 或小转移灶数目较多, 未波及全肝者. IV 级: 肝内肿块 >1 cm, 或弥散性病灶波及全肝者. 本研究中所计数的肝转移灶均为肝表面肉眼所见的病灶(表 1).

表1 小鼠部分肝切除后肝内肿瘤转移病灶分析

分组	n	肿瘤分期				
		0	I	II	III	IV
PH 组	40	0	0	3	21	16
Sham 组	38	0	3	4	27	4

^bP<0.001 vs Sham 组.

2.2 半肝切除动物的肝脏炎性细胞因子表达水平(图 1) 在手术前后不同时间获取的组织标本所测得的 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 VCAM-1 mRNA 表达水平显示, TNF- α mRNA 在 PH 后迅速开始升高, 在术后 4 d 不同时间点检测其水平升高呈一条直线关系. IL-1 β 在术后 72 h 的表达最为明显, 之后迅速降至正常水平. IL-6 mRNA 表达的峰值时间为 PH 后 48 h, 下降至正常水平的时间也较迅速. VCAM-1 mRNA 的表达在正常组织含量甚微, 几乎观测不到, 但在术后升高有两个峰值, 分别为 4 和 72 h, 可达到正常水平 3-6 倍. 结果提示, IL-1 β , IL-6 和 VCAM-1 的表达是在 TNF- α 高表达之后出现, TNF- α 可能触发了 IL-1 β , IL-6 和 VCAM-1 的表达.

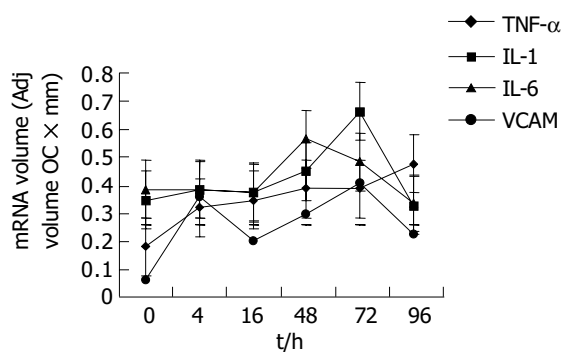


图 小鼠 PH 前后不同时间肝组织内 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 VCAM-1 mRNA 表达.

3 讨论

肝炎活性、病毒负荷以及肝功能储备是 HCC 术后复发的独立危险因素. 伴随肝炎和肝硬化的 HCC 术后复发率明显升高. 肝脏部分切除或肝移植对机体是一种创伤过程. 作为一种防御反应, 可引起肝脏本身的炎症反应以及全身性炎症反应综合征(SIRS). 无论是病毒感染引起还是手术创伤所致的肝脏炎症反应, 与肝脏肿瘤的发生及手术后的复发有着密切的关系. TNF- α ,

IL-1 β , IL-6 和 VCAM-1 等在这其中起到一定的作用. 研究认为, 炎性细胞能产生众多有助于肿瘤生长和存活物质, 其中就包括诱导 NF- κ B 产生的活性物质. 这一观点目前正成为一个快速发展的热点研究领域. TNF- α 可以诱导内皮细胞黏附分子包括血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、E-选择素 (E-selectin)、胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 的表达. 这些黏附分子在肿瘤转移的早期起到促进肿瘤细胞黏附于血管壁及向组织浸润的作用. 另外, TNF- α 激活肝细胞内细胞核因子- κ B (NF- κ B). 这种蛋白质不仅能加速细胞变异, 导致癌细胞的“疯狂”生长, 而且还能协助这种变异细胞“逃离”最初的肿瘤, 转移到身体的其他部位^[7]. IL-1 的致瘤作用可能与刺激 COX-2 的表达有关. COX-2 的主要功能是将花生四烯酸转化为 PGE₂. 他的表达受有丝分裂原、细胞因子、生长因子和肿瘤促进因子的诱导, 其中包括 IL-1、TNF- α . 研究发现, 在多种实体瘤的原发病灶、复发、转移病灶均可检测到 COX-2 的过表达. COX-2 刺激上皮细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 刺激血管生长, 增强细胞浸润, 介导免疫抑制和增加突变剂的产生等, 在乳腺、前列腺、膀胱、肺、食管、胰腺癌等癌发生方面发挥了重要作用^[4-6]. 最近 Kondo *et al*^[8] 的研究表明, 在手术后的 HCC 患者中, 癌旁组织中的 COX-2 的过表达与活动性炎症反应有关, 并且与较短的无瘤生存期相关, 提示 COX-2 的表达对术后 HCC 的复发具有促进作用. IL-6 是肝脏急性应答反应的重要递质, 是一种多功能性细胞因子, 参与肝脏产生急性期反应蛋白, 一般由 TNF- α 或 IL-1 刺激组织分泌. 因此, IL-6 的肝脏肿瘤发生及发展方面是通过诱导 TNF- α 和 IL-1 的释放起作用的. 在 TNF- α , IL-1 和 IL-6 术后的分泌水平分析, 在经历了手术创伤引发的炎症反应后, 是否炎性递质也可能为促发肿瘤转移或复发因素, 有关的研究报道甚少. 在我们前期的动物实验中, 部分肝切除前后不同时间接种肿瘤细胞后观察, 发现未手术或假手术动物的肿瘤转移程度明显轻于肝部分切除动物. 这提示我们, 创伤后的炎症反应, 尤其是炎性因子在肿瘤复发转移

过程中有一定的作用. 炎性因子的作用不仅影响肝脏的功能, 同时对残留在肝组织内的微卫星病灶的迅速生长、血流中癌细胞的着床均起一定的作用. 我们还发现, 血流中的癌细胞在术后 72 h 左右已被发现黏附于血管壁, 并穿透管壁向组织内浸润, 成为复发病灶^[3]. “炎症-癌症”有着密切的联系^[9]. 大约 20% 的人类癌症的发生和发展是由炎症诱发或促进的^[7]. 如慢性活动性肝炎、胆汁郁积性肝炎将发展为肝癌就是其中的例证. 非类固醇类抗炎药 COX-2 抑制剂可降低某些人类癌症的发病率也是例证. 近年提出肝癌治疗的微创观念, 用射频、介入、微波、冷冻等方法取代肝切除治疗肝癌, 通过大大减轻了对肝脏, 尤其是肝炎或肝硬化后肝脏的损伤, 降低手术因素引起的术后近期内肿瘤的复发.

4 参考文献

- 1 Figueras J, Ibanez L, Ramos E, Jaurrieta E, Ortiz-de-Urbina J, Pardo F, Mir J, Loinaz C, Herrera L, Lopez-Cillero P, Santoyo J. Selection criteria for liver transplantation in early-stage hepatocellular carcinoma with cirrhosis: results of a multicenter study. *Liver Transpl* 2001;7:877-883
- 2 吴孟超. 原发性肝癌的诊断和治疗进展. *中华外科杂志* 1998;36:515-518
- 3 白莉, 黄洁, 黄志强. 肝癌术后复发的影响因素研究. *中华实验外科* 1998;15:345-346
- 4 Hull MA, Fenwick SW, Chapple KS, Scott N, Toogood GJ, Lodge JP. Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:21-27
- 5 Singh B, Lucci A. Role of Cyclooxygenase-2 in breast cancer. *J Surg Res* 2002;108:173-179
- 6 Yao M, Kargman S, Lam EC, Kelly CR, Zheng Y, Luk P, Kwong E, Evans JF, Wolfe MM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res* 2003;63:586-592
- 7 Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431:461-466
- 8 Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Okami J, Ito Y, Shimizu J, Eguchi H, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Matsuura N, Wakasa K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:4005-4012
- 9 Marx J. Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* 2004;306:966-968

编辑 潘伯荣 审读 张海宁