

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)24-2285-03

β -榄香烯对兔 VX2 肾癌放疗增敏作用中 Caspase-3 及 Bcl-2 的表达

余军军^{1,2}, 王子明¹, 车向明², 种铁¹, 王亚利³(西安交通大学: ¹第二医院泌尿外科, ²肿瘤科, 陕西 西安 710004, ³第一医院普通外科, 陕西 西安 710061)

Expressions of Caspase-3 and Bcl-2 in radiosensitization of β -elemene on rabbit VX2 renal carcinoma

SHE Jun-Jun^{1,2}, WANG Zi-Ming¹, CHE Xiang-Ming², CHONG Tie¹, WANG Ya-Li³¹Department of Urology, ²Department of Oncology, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China, ³Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Xi'an 710061, China

【Abstract】 AIM: To investigate whether low-dosage β -elemene can enhance the effect of irradiation on rabbit VX2 renal carcinoma and to observe the expression changes of Caspase-3 and Bcl-2 during the process. **METHODS:** Experimental rabbits with VX2 renal carcinoma were divided into 3 groups: control, radiation and radiation + β -elemene. 10 mg/kg β -elemene emulsion was infused through the renal artery. The change of tumor's volume was measured dynamically by B-ultrasound. Then the tumor tissues were studied comparatively with light microscope and transmission electron microscope. The expressions of Caspase-3 and Bcl-2 were detected by immunohistochemistry. **RESULTS:** The tumor's volume of radiosensitivity group observed by B-ultrasound was restrained obviously and its Average-waiting-time was prolonged from (20.9 ± 1.30) d to (23.0 ± 2.13) d ($P < 0.05$). Different apoptosis were observed under transmission electron microscopy. The expressions of Caspase-3 and Bcl-2 showed gradient among these groups. **CONCLUSION:** Low-dosage β -elemene could enhance the radiosensitivity of rabbit VX2 renal carcinoma model and promoted the apoptosis through Caspase-3 pathway. It could up-regulate Bax and down-regulate Bcl-2 protein expressions.

【Keywords】 β -elemene, rabbits; VX2 renal carcinoma, radiation sensitizing agents, apoptosis

【摘要】 目的: 观察 β -榄香烯对兔 VX2 肾癌的放射增敏作

收稿日期 2006-03-02; 接受日期 2006-05-19

基金项目 国家自然科学基金(30371831)

通讯作者: 王子明. Tel: (029) 87678002 Email: Ziming-W@263.net

作者简介: 余军军. 博士生(导师王子明), 主治医师. Tel: (029)

87678002 Email: sjuns@sina.com

用以及 Caspase-3 与 Bcl-2 蛋白表达的变化. 方法: 兔 VX2 肾癌模型分为空白组、放疗组、放疗 + β -榄香烯 10 mg/kg 经肾动脉灌注(增敏组) β 组 β 超监测肿瘤体积变化. 实验结束后提取瘤体标本进行形态学观察. 免疫组化法分析 Caspase-3 及 Bcl-2 蛋白表达量的变化. 结果: 10 mg/kg β -榄香烯增敏组肿瘤体积生长受抑制, 生长延缓时间由 (20.9 ± 1.30) d 增至 (23.0 ± 2.13) d ($P < 0.05$). 透射电镜观察到不同实验组肿瘤细胞凋亡的超微结构变化. 免疫组化法显示 Caspase-3 及 Bcl-2 蛋白在各组呈梯度表达. 结论: β -榄香烯对兔 VX2 肾癌具有放疗增敏作用. 它通过 Caspase-3 途径促进肿瘤细胞凋亡. Bcl-2 蛋白表达参与该凋亡途径.

【关键词】 β -榄香烯; 兔; VX2 肾癌; 放射增敏药; 细胞凋亡

【中图分类号】 R737.11 **【文献标识码】** A

0 引言

肾癌对放射治疗不敏感, 如何提高放疗对肾癌的局部控制作用, 以及寻找高效放疗增敏剂是目前肾癌放射生物学的难点. β -榄香烯是中药莪术的主要有效成分, 可诱发肿瘤细胞凋亡, 并对肾癌 GRC-1 细胞、小鼠移植瘤 U14 等肿瘤系具有放射增敏效能^[1-2]. 本课题组前期研究发现, β -榄香烯对兔 VX2 肾癌具有放射增敏作用, 我们揭示 Caspase-3 及 Bcl-2 蛋白表达对其增敏作用的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔 60 只, 体质量 2.0 ~ 2.5 kg, 雌雄不限, 西安交通大学动物实验中心提供. VX2 瘤株由第四军医大学提供. β -榄香烯乳剂购自大连金港制药有限公司; Caspase-3 及 Bcl-2 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术公司; RPMI1640 及新鲜小牛血清购自宝泰克生物有限公司; 美国 Acuson-512 型彩色多普勒超声诊断仪; 荷兰 Philips Allura monoplane 型数字减影仪; 美国 Varian2300CD 型 6Mev 直线加速器; 日本 Hitachi H-600 型电子透射显微镜及 3FSP 微导管.

1.2 方法

1.2.1 分组 按照文献^[3-4]的方法制作兔 VX2 肾癌模型. 荷瘤兔随机分为空白组 5 只, β -榄香烯乳剂 5 只, 放疗剂量为 5, 10, 15, 20, 25 Gy 时放疗组与

增敏组各5只,在植瘤13 d 肿瘤体积达3 cm 时进行实验。 β -榄香烯乳于放疗前1 h 经肾动脉插管灌注10 mg/kg,采用小剂量超分次放射治疗(1,2,3,4,5 Gy 5 d),B超观察疗效。末次照射后6 h 处死荷瘤兔,取各组肿瘤标本行光镜及透射电镜观察。

1.2.2 肿瘤组织 Caspase-3 及 Bcl-2 蛋白表达检测

按试剂盒说明书进行操作,阳性细胞均为胞质或胞膜着色。采用 Sinicrope^[5]及李玺^[6]等综合计分法进行半定量分析。每组每例标本至少选取5个视野计分,计数1000个细胞中阳性细胞数,染色细胞 $\leq 5\%$ 为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。着色阳性细胞计分则是以多数阳性细胞呈现的染色特征计分:淡黄色为1分,黄色为2分,棕黄色为3分。二者综合得分2~3分微弱阳性(+),4~5分为中等阳性(++),6~7分为强阳性(+++)。

统计学处理:实验测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较用SNK-q检验。全部数据应用SPSS10.0软件包分析,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 6MevX-ray 放疗的差异 放射剂量为15 Gy及20 Gy时增敏组与放疗组差异有统计学意义,表明榄香烯乳剂具有放射增敏疗效($P < 0.05$,表1)。

表1 不同剂量6 Mev X射线作用时肿瘤瘤体生长差异

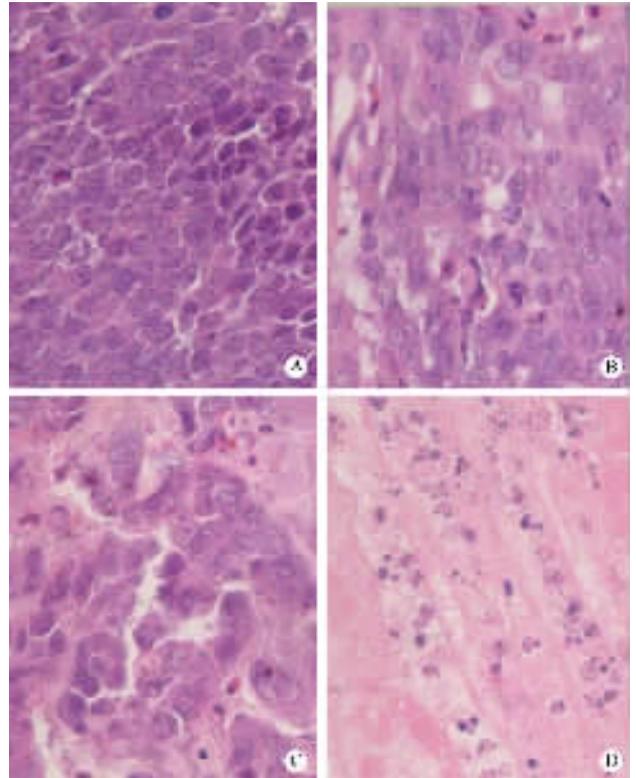
($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	D(Gy)	肿瘤达10 cm ³ 时间(d)	生长延缓 时间(d)
空白	0	18.8 ± 1.00	—
放疗	5	19.2 ± 1.00	0.4
	10	20.0 ± 1.10	1.2
	15	20.9 ± 1.30 ^a	2.1
	20	21.4 ± 1.89 ^a	2.6
	25	23.6 ± 1.78 ^a	4.8
榄香烯乳 + 放疗	5	19.4 ± 1.00	0.6
	10	20.7 ± 1.15	1.9
	15	23.0 ± 2.13 ^{ac}	4.2
	20	23.9 ± 2.20 ^{ac}	5.1
	25	24.5 ± 2.01 ^a	5.7

^a $P < 0.05$ vs 空白; ^c $P < 0.05$ vs 同剂量放疗。

2.2 肾癌组织形态学改变 光镜下空白组可见肾脏结构中肾小球和小管结构清晰,肿瘤细胞成弥漫性或

片灶状分布,偶见凋亡细胞(图1A)。 β -榄香烯乳组凋亡细胞呈点状分布(图1B)。放疗组有结缔组织增生,癌灶胶原很多,混杂纤维母细胞与血管,不同视野可见凋亡细胞散在分布(图1C)。增敏组部分肾小管上皮细胞自溶,凋亡细胞多且弥散分布于不同视野(图1D)。电镜下增敏组肾脏正常形态消失,肾小球及肾小管上皮细胞、肿瘤细胞均有染色质凝集、边集,凋亡细胞核染色质凝集成高电子密度团块,凋亡小体广泛存在(图2A)。



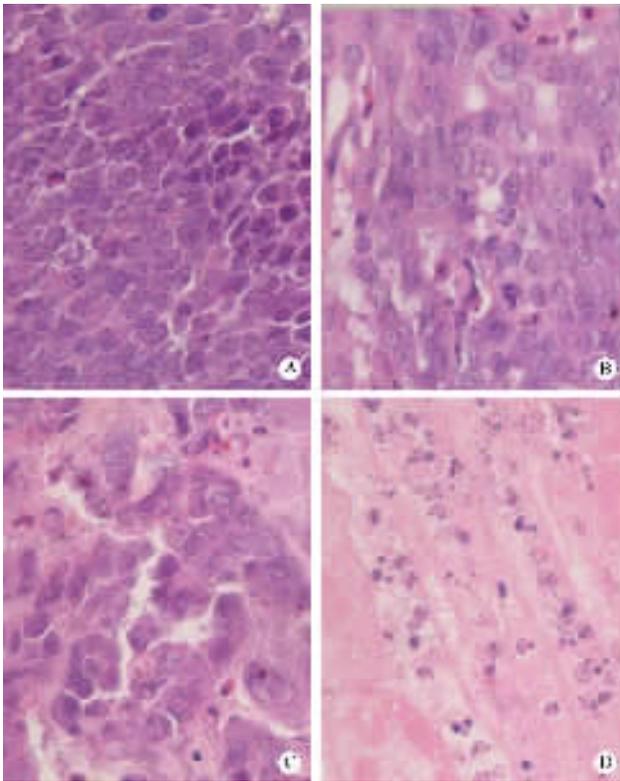
A:对照组;B:榄香烯组;C:放疗组;D:放疗+榄香烯组。

图1 VX2肾癌细胞的形态变化 HE ×400

2.3 免疫组化表达 对照组 Caspase-3 蛋白表达(图2B)阴性,增敏组中等阳性(++),且与放疗组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。Bcl-2 蛋白表达在空白组与放疗组均为弱阳性(+),增敏组表达阴性(图2C),各组间相互比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

放射增敏剂 β -榄香烯(1-甲基-1-乙基-2,4-二乙丙基环乙烷)是从姜科植物温郁金(莪术)中提取的国家二类非细胞毒性抗肿瘤新药,可促进肿瘤细胞凋亡^[7]。我们采取小剂量超分次放疗^[8],肿瘤细胞凋亡指数较单次高,且易于停留在放射敏感的时相如



A:超微结构;B:Caspase-3;C:Bcl-2.

图2 增敏组肿瘤细胞的超微结构(TEM×5000)及免疫组化表达(SABC×400)

G2期等。当放疗与 β -榄香烯同步治疗时,辐射可破坏细胞膜,使药物进入细胞内,对模型兔的血象、肝、肾功能无显著影响。本实验中 β -榄香烯对兔VX2肾癌的放射增敏比为1.89,属于中等增效药物。凋亡细胞在组织及器官中产生的同时,由内皮细胞及单核细胞将其吞噬,故而凋亡细胞的出现只有一个峰值,一般均在6h左右。本研究中各组动物均于末次实验干预后6h取材制备标本,电镜观察超微结构看到增敏组不同程度凋亡细胞广泛分布,但其他各组凋亡细胞均处于早期表现。

研究证实凋亡与放射敏感性有关。放疗敏感肿瘤易凋亡,而一些放疗抗拒的癌与肉瘤则不易发生凋亡。认识凋亡过程,通过调控某些基因表达或影响细胞因子的量和活性,能改变特定靶细胞的放射敏感性^[10]。本实验提示小剂量 β -榄香烯(10 mg/kg)可显著增加射线引起的兔VX2肾癌肿瘤细胞凋亡,并增加Caspase-3蛋白表达。Caspase-3是一组特异性切割天门冬氨酸的半胱氨酸蛋白酶,通常以无活性的酶原形式存在于细胞中,在氧化剂、放射线、病原体、炎症反应等诱引作用下,通过线粒体细胞色素C通路、死亡受体通路或内质网通路激活启动Caspase,继而激活下游的效应Caspase发生不可逆的级联反应。

Caspase是凋亡关键的效应子,它可作用于多种底物,进而引起细胞凋亡的各种生化和形态学改变。本研究提示, β -榄香烯通过Caspase-3途径促进兔VX2肾癌肿瘤细胞凋亡,从而具有增敏作用。

Bcl-2基因在细胞凋亡调节中起重要作用,Bcl-2基因可抑制许多刺激诱发的凋亡,可以抑制多种因素包括辐射及Caspase的诱导凋亡作用。其基因表达产物蛋白质主要分布于线粒体外膜、核膜和肌浆网膜表面,细胞内Bcl-2基因水平被认为能影响肿瘤的放射敏感性^[11]。 β -榄香烯增加放疗引起的DNA分子损伤,可显著下调Bcl-2表达并诱导细胞凋亡,其作用机制有待进一步研究。

【参考文献】

- [1]程伟,乔哲,石涛,等. 榄香烯对肾癌GRC-1细胞的放射增敏作用[J]. 西安交通大学学报(医学版) 2004, 25(2): 182-185.
- [2]邹丽娟,孙秀华,徐晓颖,等. 榄香烯对小鼠移植瘤U14放疗增敏的实验研究[J]. 中华放射医学与防护杂志 2004, 24(3): 254-255.
- [3]王子明,余军军,程伟,等. 兔VX2移植瘤模型的建立及其超声显像检测[J]. 西安交通大学学报(医学版) 2006, 27(1): 55-58.
- [4]余军军,王子明,程伟,等. 兔VX2肾癌模型的建立及其影像学表现[J]. 第四军医大学学报 2006, 27(7): 584-586.
- [5]Sinicrope FA, Ruan SB, Clear KR, et al. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis[J]. Cancer Res, 1995, 55: 237-241.
- [6]李玺,张召辉. 大鼠移植胰腺冷缺血再灌注后细胞凋亡及其调控基因的研究[J]. 中华普通外科杂志 2004, 11(19): 581-583.
- [7]徐英辉,董斌,罗其中,等. 榄香烯对大鼠胶质瘤C6细胞Bcl-2家族基因及蛋白表达的影响[J]. 中华医学杂志 2005, 85(24): 1700-1703.
- [8]段永建,唐文春,韩晓莉,等. 大剂量常规分次与低分割三维适形放射治疗原发性非小细胞肺癌[J]. 第四军医大学学报 2004, 25(19): 1762-1764.
- [9]Deplaque G, Ceraline J, Becherel MC, et al. Caffeine and G2/M block override: a concept resulting from a misleading cell kinetic delay independent of functional p53[J]. Int J Cancer, 2001, 94(3): 363-369.
- [10]Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, et al. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 14973-14977.
- [11]刘承勇,杨开军,任文德,等. p53和Bcl-2表达与BT325细胞放射性凋亡的关系[J]. 中华放射医学与防护杂志 1998, 12(2): 87-90.