

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.02.007

健择联合电子线照射对人胰腺癌裸鼠移植瘤凋亡的影响

王 磊¹, 沈泽天², 朱锡旭²

Effect of Gemzar Combined with Electron Ray on Tumor Apoptosis in Nude Mice Xenograft of Human Pancreatic Carcinoma

WANG Lei¹, SHEN Ze-tian², ZHU Xi-xu²

1. Department of Clinical School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210002, China; 2. Department of Radiotherapy Center, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA Corresponding Author: ZHU Xi-xu, E-mail: zhuxixu@hotmail.com

Abstract; Objective To investigate the effect of gemzar combined with electron ray on tumor apoptosis in nude mice xenograft of human pancreatic carcinoma. **Methods** 36 xenograft models of human pancreatic carcinoma were established. They were randomly divided into control group(A) radiation group (B) Gemzar 25 mg/kg group (C) Gemzar 50mg/kg group (D) combined treated group1 (E) and combined treated group2(F). Were injected with normal saline B treated with 6MeV electron ray on the tumor; C and D were injected with Gemzar 25 mg/kg and 50mg/kg respectively and E & F were injected with Gemzar 25 mg/kg and 50mg/kg respectively before treated with additional 6Mev electron ray on the tumor. The method of immunohistochemistry was used to estimate the expression of apoptosis inhibitory protein Bcl-2 and apoptosis associated protein Bax, while the apoptosis of tumor cell was detected by TUNEL to determine apoptotic index(AI). **Results** Compared with the control group the apoptosis of tumor cell in treated groups was notably raised and the statistical differences of the apoptotic index(AI) among treated group were significant($P < 0.05$). Immunochemical showed that as compared with the control group, expressions of Bcl-2 was down-regulated while Bax was up-regulated in all the treated groups to some extent(both $P < 0.05$). Also significant difference was also shown in comparison of the two indices between the combined treated group and group B to D($P < 0.05$). **Conclusion** Gemzar combined with electron ray effectively induces apoptosis of tumor cells in the xenografts.

Key words: Gemzar; Radiation; Pancreatic carcinoma; Apoptosis

摘要:目的 探讨健择联合电子线外照射对人胰腺癌细胞株(panc-1)裸鼠移植瘤细胞凋亡的作用。**方法** 建立人胰腺癌 panc-1 裸鼠移植瘤模型,36 只裸鼠随机分为 6 组:对照组(A 组)、单纯放疗组(B 组)、健择 25 mg/kg 组(C 组)、健择 50 mg/kg 组(D 组)、联合治疗 1 组(E 组)、联合治疗 2 组(F 组)。A 组裸鼠尾静脉注射 0.9%氯化钠溶液,B 组荷瘤鼠背部肿瘤局部以 6MeV 电子线照射。C、D 组分别以 25 mg/kg、50 mg/kg 健择裸鼠尾静脉注射,E、F 组分别以 25、50 mg/kg 健择裸鼠尾静脉注射加背部肿瘤 6MeV 电子线照射。采用 TUNEL 法检测凋亡指数(AI),免疫组织化学检测凋亡抑制蛋白 Bcl-2、凋亡相关蛋白 Bax 的表达情况。**结果** 干预组较对照组肿瘤细胞凋亡明显增加,干预组各组之间凋亡指数比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组织化学结果显示:与对照组比较,干预各组均可不同程度下调 Bcl-2 蛋白表达,Bax 蛋白表达上调($P < 0.05$),联合治疗组与其他各组比较,Bcl-2 蛋白表达降低,Bax 蛋白表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 健择联合电子线对人胰腺癌移植瘤的凋亡有促进作用。

收稿日期:2010-03-23;修回日期:2010-06-08

基金项目:南京军区南京总医院 2009 年院青年基金课题资助项目(2009Q051)

作者单位:1. 210002 南京,南京大学医学院临床学院;2. 南京军区南京总医院放疗科

通信作者:朱锡旭,E-mail:zhuxixu@hotmail.com

作者简介:王磊(1982-),男,硕士,住院医师,主要从事肿瘤的放射生物学研究

关键词:健择;电子线;胰腺癌;凋亡

中图分类号:R730.58;R735.9

文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2011)02-0144-04

0 引言

胰腺癌的发病率国内外均呈上升趋势,已经成为常见的消化系统恶性肿瘤之一。早期胰腺癌常无明显症状,临床确诊时已大多为晚期^[1],总体 5 年生存率<5%。放疗是中晚期胰腺癌姑息治疗的主要手段,并成为提高总生存率的关键。健择是一种核苷类似物,已证明是一种放射增敏作用强而不良反应较小的药物,也是胰腺癌化疗的一线用药,是化疗药物类的增敏剂。本实验将健择与电子线联合应用治疗人胰腺癌 panc-1 细胞裸鼠移植瘤,观察健择联合电子线对人胰腺癌裸鼠移植瘤凋亡的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

BALB/C-nu/nu 裸小鼠,4~6 周龄,雄性,体重 18~22g,购自南京军区南京总医院比较医学科,在无特定病原体动物(SPF)条件下饲养。人胰腺癌细胞株(panc-1),由南京鼓楼医院肝胆研究所提供。健择:200 mg/瓶,Lilly 公司提供,用时以 0.9%氯化钠溶液溶解;小牛血清:美国 Sigma 公司产品;RPMI1640 培养液,Gibco 公司产品;胰酶购自 Difco 公司;BAX 抗体、Bcl-2 抗体购自南京建成生物工程研究所;SP 双染试剂盒、DAB 显色试剂盒均为福州迈新公司。Elekta Precise 直线加速器(瑞典),剂量率 300 cGy/min。

1.2 荷人胰腺癌 panc-1 细胞裸鼠模型建立

将人胰腺癌 panc-1 细胞培养于 RPMI1640 培养液中,加入 10%小牛血清,37℃,5%CO₂ 的条件下培养至对数生长期,用 0.25%胰酶消化成细胞悬液,锥虫蓝拒染法计数活细胞占 95%以上,用无血清 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 3×10⁷/ml,在 42 只裸小鼠的背部皮下各接种 0.2ml(6×10⁶ 个细胞/只)。

1.3 实验分组与处理

39 只成瘤,取其中的 36 只随机分六组。裸鼠背部肿瘤生长至 5mm 时开始进行干预,A 组:裸鼠尾静脉注射 0.9%氯化钠溶液;B 组:裸鼠背部肿瘤局部以单次 16Gy 电子线照射;C、D 组:裸鼠尾静脉分别注射健择 25、50 mg/kg; E、F 组:裸鼠尾静脉分别注射健择 25、50 mg/kg,12h 后每只裸鼠背部肿瘤以单次 16Gy 电子线照射。照射方法:每次 3 只裸鼠,氯氨酮 2ml 稀释 10 倍后,尾静脉注射 0.2ml,麻醉后将裸鼠固定于操作台上,采用 6MeV 电子线照射,背部肿瘤置于放射野中,其他部分用 1cm 厚铅橡皮遮蔽。给药方法:根据实验分组和每只裸鼠的体重计算具体给药剂量,尾静脉注射已经稀释好的药物,对照组注射同等体积的 0.9%氯化钠溶

液。观察荷瘤鼠的一般情况,由专人用游标卡尺测量移植瘤的最大径(A)和最短径(B),肿瘤体积 $V = \pi/6 \cdot AB^2$ 。共观察 1 月。肿瘤抑制率 = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重 × 100%。

1.4 TUNEL 法(原位 3'羟基末端标记法)检测各组移植瘤组织细胞凋亡情况

细胞内有棕黄色粗颗粒分布或棕黄色细颗粒弥漫分布者为阳性反应,每张切片随机选择 10 个连续高倍(×400)视野,计数每个视野内上述阳性细胞各占所有细胞的比例即凋亡率,取其平均值作为凋亡指数(AI)。

1.5 凋亡抑制蛋白 Bcl-2 和凋亡相关蛋白 Bax 的检测

采用免疫组织化学染色,每组各抽取移植瘤标本 5 例。按试剂盒说明书完成免疫染色各步骤。Bcl-2 及 Bax 的阳性表达主要定位于细胞质中,因此阳性表达即为细胞质染成棕黄色。10×40 高倍镜下随机计数 10 个高倍视野,不少于 1 000 个细胞,计数阳性细胞数,以百分数表示。

1.6 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用方差分析及成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠一般情况及生长状况

36 只裸鼠完成实验,实验各组裸鼠均未发现肺、肝等转移。对照组、健择用药组及联合治疗组裸鼠进食、活动无异常,单纯照射组 1 只裸鼠肿瘤表面皮肤于照射后第 3 天出现红肿,无渗出。联合治疗组肿瘤体积及瘤重均低于对照组及单纯用药及照射组,见表 1。

表 1 各组裸鼠移植瘤生长指标
Table 1 Comparison of growth index of xenografts in nude mice of all group

Groups	Tumor Volume (mm ³ , $\bar{x} \pm s$)		Tumor Weight	Inhibition rate
	0d	30d	(g, $\bar{x} \pm s$)	%
A	60.32 ± 5.89	1805.9 ± 15.87	3.65 ± 0.11	—
B	61.50 ± 4.16	1161.2 ± 339.51	2.04 ± 0.11	44.11
C	62.57 ± 4.40	664.35 ± 136.52	0.99 ± 0.09	72.88
D	65.32 ± 4.64	541.10 ± 28.81	0.82 ± 0.04	77.53
E	63.53 ± 3.32	171.08 ± 21.35	0.43 ± 0.07	88.22
F	64.62 ± 3.43	122.55 ± 15.70	0.32 ± 0.05	91.23
P	>0.05	<0.001	<0.001	—

2.2 各组移植瘤 TUNEL 法检测凋亡结果

凋亡细胞为棕色,正常细胞为蓝紫色。结果显示,联合治疗两个亚组凋亡最明显,其次为健择

50mg/kg 组, 25mg/kg 组, 单纯照射组, 对照组凋亡最少, 见图 1。干预组较对照组肿瘤细胞凋亡明显增加, 干预组各组之间凋亡指数比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组移植瘤凋亡指数(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 comparison of apoptosis rate in six groups(%, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Example	Apoptosis index(AI)
Control group (A)	5	2.13 ± 0.41
Radiation group (B)	5	8.42 ± 1.30
Gemzar 25mg/kg group (C)	5	12.62 ± 1.17
Gemzar 50mg/kg group (D)	5	19.57 ± 0.90
Combined treated group1 (E)	5	24.31 ± 1.51
Combined treated group2 (F)	5	36.84 ± 2.29

Note: compared between every group, $P < 0.05$

2.3 各组移植瘤 Bcl-2 和 Bax 表达率

细胞质染成棕黄色即为阳性表达, 免疫组织化学结果显示, Bcl-2 蛋白表达情况为: 对照组表达强阳

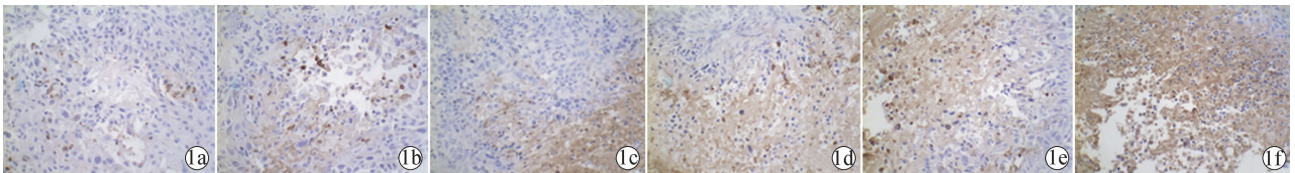
性, 其次为单纯照射组, 健择 25mg/kg 组, 50mg/kg 组, 联合组阳性表达率较少, 见图 2; Bax 蛋白表达情况为: 联合组表达强阳性, 其次为健择 50mg/kg 组, 25mg/kg 组, 单纯照射组, 对照组阳性表达较少, 见图 3、表 3。

表 3 各组移植瘤 Bcl-2 和 Bax 阳性表达率(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression ratio of bcl-2 and Bax in six groups

Groups	Example	Bcl-2	Bax
Control group (A)	5	90.56 ± 3.87	40.73 ± 2.69
Radiation group (B)	5	79.14 ± 2.62 ^{*#}	52.52 ± 3.86 ^{*#}
Gemzar 25mg/kg group (C)	5	70.02 ± 3.50 ^{*#△}	59.97 ± 1.72 ^{*#△}
Gemzar 50mg/kg group (D)	5	61.74 ± 4.23 ^{*#}	68.06 ± 3.56 ^{*#}
Combined treated group1 (E)	5	46.68 ± 2.35 ^{*▲}	82.72 ± 3.97 ^{*▲}
Combined treated group2 (F)	5	37.54 ± 3.92 [*]	94.84 ± 4.59 [*]

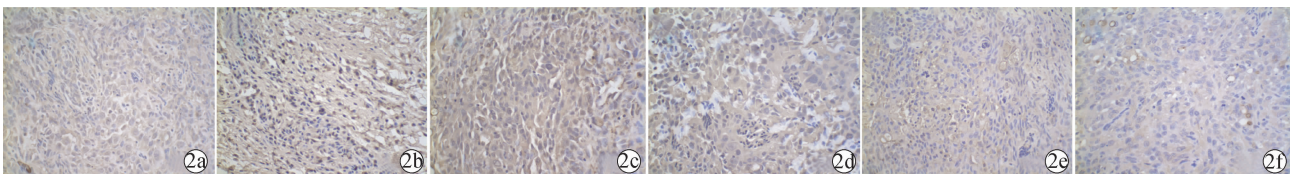
Note: vs. Group A, * $P < 0.05$; vs. Group E, F, # $P < 0.05$; vs. Group D, $\Delta P < 0.05$; vs. Group F, $\blacktriangle P < 0.05$



1a: control group; 1b: radiation group; 1c: gemzar 25 mg/kg group; 1d: gemzar 50 mg/kg group; 1e: combined treated group 1; 1f: combined treated group 2

图 1 各组裸鼠移植瘤组织 TUNEL 检测结果(BIOTIN 标记 POD 法 × 400)

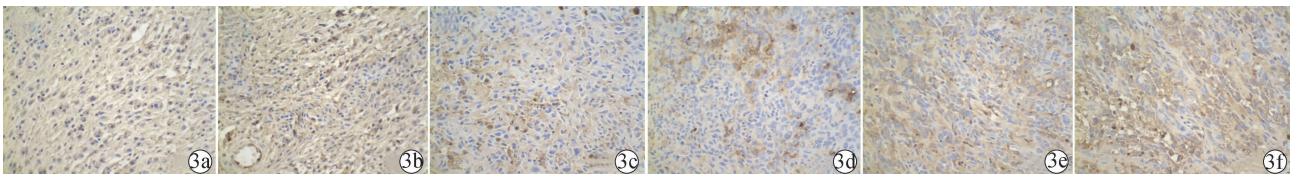
Figure 1 Result of TUNEL in every group of nude mice xenograft(BIOTIN × 400)



2a: control group; 2b: radiation group; 2c: gemzar 25 mg/kg group; 2d: gemzar 50 mg/kg group; 2e: combined treated group 1; 2f: combined treated group 2

图 2 各组裸鼠移植瘤组织 Bcl-2 蛋白表达情况(SP 双染 × 400)

Figure 2 Expression of Bcl-2 in six groups of nude mice xenograft(SP × 400)



3a: control group; 3b: radiation group; 3c: gemzar 25 mg/kg group; 3d: gemzar 50 mg/kg group; 3e: combined treated group 1; 3f: combined treated group 2

图 3 各组裸鼠移植瘤组织 Bax 蛋白表达情况(SP 双染 × 400)

Figure 3 Expression of Bax in six groups of nude mice xenograft(SP × 400)

3 讨论

放疗是胰腺癌综合治疗的重要手段之一,但胰腺癌对放射线的低敏感度和放射线对胰腺周围脏器的损伤,限制了放疗在胰腺癌治疗中的应用。对于低敏感度组织,控制肿瘤生长可以通过以下两种途径:(1)高效低毒的放射增敏剂可增加胰腺癌细胞对放射的敏感性,进而提高放疗对局部的控制率。(2)提高单次照射剂量,单次剂量越大,生物效应越大。BED^[2](等效生物剂量)的提高依赖于单次剂量的提高。

健择产生放疗增敏作用,是因为它能引起肿瘤细胞群中对放射耐受的 S 期细胞明显减少,并使存活细胞同步进入对放射敏感的 G₂ 和 M 期。同时它的细胞毒作用使细胞数减少,增加了肿瘤细胞的再氧合,使原先不敏感的乏氧细胞对放射敏感^[3]。研究表明,健择在放射治疗之前给药具有增敏作用^[4]。因此我们采用照射前尾静脉给药方式研究健择联合单次大剂量放疗对人胰腺癌移植瘤裸鼠的促凋亡作用。

健择和单次大剂量放疗联合运用可以起到相互修饰的作用,可能机制为^[5]:(1)抑制放射损伤的修复;(2)细胞同步化;(3)放疗后肿瘤细胞的再群体化常是治疗失败的一个重要因素。受照射后细胞常分裂得更快,导致在下次放疗前出现肿瘤的部分再生长,只要药物对该特定肿瘤有效,可使上述过程减慢;(4)化疗药物可能增加从不活跃的细胞周期时相转往活跃的周期时相的肿瘤细胞数;(5)肿瘤体积可因两种措施中任何一种措施而减少,从而为另一种措施提供更好的杀灭细胞的条件。

细胞凋亡调控失调是导致肿瘤发生、发展的重要方面,其中 Bcl-2 家族^[6]备受重视。Bax 是该家族的重要成员,它是第一个被确定的 Bcl-2 的同源基因,可以拮抗 Bcl-2 的保护效应而使细胞趋于凋亡^[7]。

TUNEL 法检测凋亡结果显示:实验干预各组较对照组肿瘤细胞凋亡明显增加,干预组各组之间凋亡指数比较差异有统计学意义。免疫组化结果显示:与对照组比较,干预各组均可不同程度下调 Bcl-2 蛋白表达,Bax 蛋白表达上调,($P < 0.05$),联合治

疗组与其他各组比较,Bcl-2 蛋白表达降低,Bax 蛋白表达升高,差异有统计学意义,表明健择联合放疗较单纯放疗或单药健择有明显的促肿瘤细胞凋亡作用,两者联合起到了协同治疗作用。实验结果看出健择 50mg/kg 剂量组促进肿瘤凋亡强于 25mg/kg 剂量组,并且健择 50mg/kg 联合电子线照射组在促进肿瘤细胞凋亡方面优于 25mg/kg 联合电子线照射组,实验中通过 HE 染色观察各组裸鼠心、肺、肝、肾等器官无明显病理变化。但是相关文献^[8-9]报道,健择联合放疗治疗胰腺癌会增加肺、消化道损伤及骨髓抑制,不良反应呈剂量依赖性,其原因主要是健择属于化疗药物类的增敏剂,其自身单药就具有明显的消化道损伤及骨髓抑制副作用。因此在健择联合单次大剂量放疗治疗胰腺癌的模式下,摸索健择的安全剂量尤其重要。

参考文献:

- [1] Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, et al. Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134 (4): 981-987.
- [2] 王志震,袁智勇. 射波刀—低分割单次大剂量立体定向放射治疗的最佳执行者[J]. *中国肿瘤临床*, 2009, 36(4): 234-237.
- [3] Mason KA, Milas L, Hunter NR, et al. Maximizing therapeutic gain with gemcitabine and fractionated radiation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1999, 44 (5): 1125-1135.
- [4] Pauwels B, Korst AE, Lardon F, et al. Combined Modality Therapy of Gemcitabine and Radiation[J]. *Oncologist*, 2005, 10 (1): 34-51.
- [5] 沈瑜,糜福顺. 肿瘤放射生物学[M]. 2 版. 北京:中国医药科技出版社, 2009: 295-298.
- [6] 杨长永,冯永东,黄丹,等. TNF- α 诱导 Molt-4 细胞 Bcl-2 蛋白磷酸化的周期特异性[J]. *肿瘤防治研究*, 2010, 37(3): 251-254.
- [7] Fennell DA, Chacko A, Mutti L. BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib[J]. *Oncogene*, 2008, 27(9): 1189-1197.
- [8] Rube CE, Wilfert F, Uthe D, et al. Increased expression of pro-inflammatory cytokines as a cause of lung toxicity after combined treatment with gemcitabine and thoracic irradiation[J]. *Radiother Oncol*, 2004, 72(2): 231-241.
- [9] Zinner RG, Komaki R, Cox JD, et al. Dose escalation of gemcitabine is possible with concurrent chest three-dimensional rather than two-dimensional radiotherapy; a phase I trial in patients with stage III non-small-cell lung cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 73(1): 119-127.

[编辑:周永红;校对:朱宇泽]