

125 粒子植入照射对纤维肉瘤 S180 瘤株的治疗作用及其机制

周培清¹, 崔亚利²

Therapy Effectation and Mechanism of S180 Tumor Cell by ¹²⁵ Seed Implantation

ZHOU Pei-qing¹, CUI Ya-li²

1. College of Clinical Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China;

2. Department of Nuclear Medicine, The Tumor Hospital of Harbin Medical University

Abstract: **Objective** Therapy effectation and mechanism of S180 tumor cell by ¹²⁵ seed implantation. **Methods** The study use S180 tumor cell, 36 male Kunming mice were divided into 3 groups in random, 12 mice each group: contrast, radiation and ¹²⁵ seed implantation. Radiation: 4-MV X-ray, 200 cGy/fraction, three fraction. ¹²⁵ seed implantation: insert the seed into the mouse tumor using the special-made needle. One seed was implanted into six mice, two into another six mice. The model mice of radiation were sacrificed at 6 h, 30 h and 54 h. The model mice of seed implantation were sacrificed at 4 d and 8 d. The fresh tumor tissue sample were examined apoptosis by TuNEL, measured the apoptois index (AI) and p53 were measured by immunocytochemistry. **Results** (1) The contrast group can also have spontaneous apoptosis without treatment. But the apoptosis appeared late with lower apoptosis index. (2) Radiation can induce cell apoptosis and the apoptosis index increased with the time went by. (3) ¹²⁵ seed implantation can induce S180 cell apoptosis. The peak value within 4 d and with the increase of implanted seed, the AI increased. The comparison between 2 seeds and 1 seed has significant difference within 4 d and 8 d ($P < 0.05$). (4) p53 count not be found in S180 tumor cell. **Conclusion** (1) S180 tumor cell are less sensitive to radiation. The radiosensitivity is not related to mutated-type p53 (mtp53). (2) ¹²⁵ seed implantation and radiation all can induce S180 tumor cel apoptosis. The induced apoptosis mechanism is not related to mutated-type p53. (3) ¹²⁵ seed implantation is effective method in the treatment of carcinomas.

Key words: Iodiane-125; Implantation radiation; S180 tumor cell; Radiation; Apoptosis

摘要: **目的** 探讨¹²⁵ 粒子植入内照射治疗对纤维肉瘤 S180 瘤株的疗效及其治疗机制。 **方法** 本试验选用纤维肉瘤细胞 S180 株, 通过 36 只雄性昆明种小鼠, 建立纤维肉瘤动物模型, 随即分成 3 组: 对照组、外放疗组、¹²⁵ 粒子内放疗组, 每组 12 只小鼠。外放疗组采用直线加速器照射 200 cGy/次, 剂量率为 210 cGy/分, 1 次/d, 共 3 次。¹²⁵ 粒子内放疗组通过特制长穿刺针将¹²⁵ 粒子插入小鼠瘤体内, 其中 6 只小鼠植入 1 个粒子, 另外 6 只小鼠植入 2 个粒子。外放疗组照射后 6、30、54 h 取材, 内放疗组于粒子植入后 4、8 d 取材, 瘤体标本用甲醛固定, 用原位末端标记法 (TUNEL 法) 检测凋亡细胞, 测定凋亡指数 (AI), 用免疫组化方法检测 p53 蛋白。 **结果** (1) 对照组未经治疗, 也可发生自发性凋亡, 但凋亡出现时间较晚, 凋亡指数较小。(2) 外放疗可以诱导细胞凋亡, 且随着时间推移, 凋亡指数有所增加。(3) ¹²⁵ 粒子植入内照射治疗可以诱导 S180 纤维肉瘤细胞凋亡, 凋亡指数达到峰值的时间在 4 d 左右, 且随着植入粒子的增多, 照射剂量的增加, 细胞凋亡指数也随着增加。2 个粒子内照射组与 1 个粒子内照射组比较, 4、8 d P 均 < 0.05 。(4) p53 免疫组阴性。 **结论** (1) S180 瘤株对放疗敏感性较差, 其放疗敏感性与突变型 p53 状态无关。(2) ¹²⁵ 粒子植入内照射和外放疗一样, 可诱导纤维肉瘤 S180 瘤株细胞凋亡, 而且随着植入粒子的增多, 凋亡指数也随之增加, 有显著杀伤作用, 其诱导细胞凋亡机制与突变性 p53 基因状态无关。(3) ¹²⁵ 粒子植入照射是治疗肿瘤的一种有效方法。

关键词: ¹²⁵ 粒子植入照射; S180 瘤株; 放疗; 凋亡

中图分类号: R730.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2007)08-0582-04

收稿日期: 2006-07-11; 修回日期: 2006-10-02

作者单位: 1. 028000 内蒙古通辽, 内蒙古民族大学医学院医学综合教研室; 2. 哈尔滨医科大学肿瘤医院核医学科

作者简介: 周培清 (1973-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事核医学研究

0 引言

¹²⁵ 粒子植入治疗肿瘤, 属于内照射中近距离放射治疗的内容之一, 是一种新的内照射治疗方法^[1]。在肿瘤治疗中有非常理想的局部控制率, 引

起了国内外许多学者的关注。本实验利用 S180 纤维肉瘤细胞,通过昆明鼠建立纤维肉瘤动物模型,分别采用外照射治疗和¹²⁵I 粒子植入内照射治疗进行对比研究,探讨不同时间、不同剂量¹²⁵I 粒子内照射的疗效以及从分子和基因水平探讨其治疗机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 鼠纤维肉瘤株(S180 株),由黑龙江省肿瘤医院研究所提供。

1.1.2 动物 雄性昆明小鼠,体重 18~20 g,由黑龙江省肿瘤医院研究所动物室提供。

1.1.3 放射性¹²⁵I 粒子源 放射活度 0.5~0.75 mci,直径 0.8 mm,长度 4.5 mm,由宁波君安药业科技有限公司提供。

1.1.4 主要试剂 p53 免疫组化试剂盒(一抗:兔 IgG;二抗:封闭山羊血清),购于博士德生物工程有限公司,原位末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.1.5 主要仪器 直线加速器 EL KTA Pricinel (瑞典),M-J188 型石蜡切片仪(HISTOKRYOTOM 产品),日本 Olympus 公司普通光学显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 动物与肿瘤模型制作

纯系健康雄性昆明小鼠 36 只,体重 18~20 g,收集 S180 纤维肉瘤细胞悬液,计数后制成 1.5×10^6 个/ml,与每只昆明小鼠右后肢皮下接种 0.2 ml (3×10^5 个) S180 纤维肉瘤细胞,接种后 5 d,即可触及皮下肿瘤结节,成功率 100%。

1.2.2 实验分组

待肿瘤长至 1 cm² 时,将 36 只昆明小鼠随机分成 3 组:对照组、外照射组、放射性¹²⁵I 粒子植入内照射组,每组 12 只。对照组:饲养环境相同,不给实验处理。外照射组:采用直线加速器,4MV-X,源皮距 100 cm,小鼠用戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后,将荷瘤小鼠后肢放于照射野内,2 Gy/次,剂量率为 210 cGy/次,1 次/d,共 3 次。¹²⁵I 粒子植入内照射治疗组:¹²⁵I 粒子长 4.5 mm,直径 0.8 mm,外壳用钛金属封闭,每粒活度为 0.5~0.75 mci,半衰期为 59.6 d,能量为 27.4~31.5 keV,通过专用的特制长穿刺针将¹²⁵I 粒子经皮插进小鼠右后肢内,其中 6 只小鼠各植入 1 个¹²⁵I 粒子,另外 6 只小鼠各植入 2 个¹²⁵I 粒子。

1.3 取材

实验处理完毕后,外照射组于照射 6、30、50 h 取材,内照射组于¹²⁵I 粒子植后 4、8 d 取材,颈椎脱

臼处死小鼠,摘除皮下肿瘤,制备标本。瘤体标本用甲醛固定,用于免疫组化检验 p53 蛋白和 TUNEL 法测定凋亡细胞。

1.4 末端脱氧核苷酸原位标记法(TUNEL)测定凋亡细胞

检测方法:组织切片常规石蜡脱水;3%双氧水(H₂O₂),洗 3 次;蛋白酶 K(20 μg/ml)溶于 Tris/HCL 中,pH 7.4~8.0,37℃ 消化后再次洗涤;标本经保湿处理后,每张切片取末端脱氧核糖核酸转移酶和 Dig-dUTP 各 1 μl,加入 18 μl 标记缓冲液中混匀,甩去切片上多余液体后,加标记液 20 μl/片,置样品于湿盒中,37℃ 标记 2 h,PBS 洗 3 次;加酶标抗荧光素抗体,37℃、30 min,PBS 洗 3 次;加 DAB 显色 10~30 min,水洗;加苏木精轻度复染;脱水,透明,封片,镜检。观察标准:光镜下见细胞核内有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞,细胞凋亡定量法:每张切片染色后,随机取 5 个典型的高倍视野($\times 400$),不少于 1000 个细胞,阳性细胞数以百分数表示,即为凋亡指数(AI)^[2]。

1.5 免疫组化方法检测 p53 蛋白

正常 p53 蛋白在细胞中易水解,半衰期为 20 min,因而用免疫组织化学方法不能检测到 p53 蛋白,而突变型 p53 蛋白构型发生改变,蛋白稳定性增加,导致半衰期延长,可达 2~12 h,可通过免疫组化检出,故 p53 阳性即提示突变型 p53 基因存在^[3]。

检测方法:载玻片防脱片处理;切片常规脱蜡入水;3%双氧水,室温 5~10 min,蒸馏水洗 3 次;将切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾后,断电间隔 5~10 min 后,反复 1~2 次;滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加适当稀释的一抗(兔 IgG) 4 过夜,PBS 洗 3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~30 min,20 min,PBS 洗 3 次;滴加试剂 SABC,20~37℃,20 min,PBS 洗 5 min 4 次;DAB 显色,镜下见阳性或背景略显黄色,水洗终止;苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,镜检。结果评估:p53 蛋白染色阳性细胞为核内染成棕黄色,阴性细胞核为兰色,胞浆不着色。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 软件包对数据进行处理,数据比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 外照射治疗与¹²⁵I 粒子植入治疗致纤维肉瘤细胞凋亡的变化(TUNEL 检测结果)

以细胞出现棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片

选择 5 个 400 倍视野,计数 1 000 个细胞,阳性细胞以百分数表示,即凋亡指数(AI)。

对照组无实验处理时,肿瘤细胞在 54 h 内没有发生凋亡,而外放疗组肿瘤细胞发生凋亡。随时间推移,凋亡指数在逐渐增加,经 *t* 检验,各时间段外放疗组与对照组相比较 $P < 0.05$,故可以为外放疗组与对照组凋亡指数不同,差异有统计学意义,见表 1。

表 1 外放疗组与对照组细胞凋亡指数对比($\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	30 h	54 h
对照组	0.0	0.0	0.0
外放疗组	0.092 ± 0.025 *	0.096 ± 0.017 *	0.127 ± 0.024 *

* 与对照组比较 $P < 0.05$

对照组虽未经实验处理,但肿瘤细胞也可发生凋亡,第 4 d 与第 8 d 凋亡指数比较 $P > 0.05$ 无统计学意义。1 个粒子内照射组第 4 d 时凋亡指数较高,而第 8 d 时凋亡指数反而有所下降,两者比较 $P < 0.05$,差异有统计学意义,1 个粒子内照射组第 4 d 取材时凋亡指数与对照组第 4 d 时比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义,而第 8 d 时凋亡指数与对照组第 8 d 时凋亡指数的差异无统计学意义。2 个粒子内照射组凋亡指数同样在第 4 d 时最高,在第 8 d 时反而有所下降,两者比较 $P < 0.05$,有统计学意义。且与 1 个粒子内照射组比较,第 4、8 d P 值均 < 0.05 ,差异有统计学意义。说明随着照射剂量增加,凋亡指数也相应增加,见表 2。

表 2 ¹²⁵ 粒子植入内照射组与对照组细胞凋亡指数($\bar{x} \pm s$)对比

组别	4 d	8 d	<i>P</i>
对照组	0.032 ± 0.012	0.063 ± 0.016	> 0.05 (2.68)
1 个粒子内照射组	0.131 ± 0.024 *	0.083 ± 0.017	< 0.05 (2.82)
2 个粒子内照射组	0.289 ± 0.039 **	0.206 ± 0.030 **	< 0.05 (2.92)

注: *P* 值为同一组中第 4 d 与第 8 d 取材细胞凋亡指数的比较,括号内为 *t* 值。* 与对照组比较 $P < 0.05$ ($t = 6.39$); ** 2 个粒子内照射组与 1 个粒子内照射组比较,第 4 d 时 $P < 0.05$ ($t = 5.98$),第 8 d 时 $P < 0.05$ ($t = 6.18$)

2.2 p53 蛋白

各组(对照组、外放疗组及¹²⁵ 粒子内照射组)不同取材时间,p53 蛋白始终为阴性,未检出 p53 蛋白染色阳性细胞。

3 讨论

本实验目的是探讨¹²⁵ 粒子植入治疗肿瘤疗效以及从分子和基因水平探讨其治疗机制。

临床上应用放疗的作用机制之一就是诱导敏感

细胞发生凋亡,所以检测凋亡是疗效评价的一个指标。采用 TUNEL 检测法。本实验外照射剂量共 6 Gy,外照射剂量率比较高,为 210cGy,照射后很快即可诱导肿瘤细胞发生凋亡,故外照射 6 h 后即可取材,而¹²⁵ 粒子植入内照射剂量率低,¹²⁵ 粒子初始剂量率仅为 7.7 cGy/h,需要长时间持续照射才能起到杀伤肿瘤细胞的作用。理论上,¹²⁵ 粒子植入肿瘤内第 4 d 时,其释放的剂量与外照射的剂量 6 Gy 相近,故本实验内照射取材时间选在第 4 d。

从本实验得出:

(1) 对照组肿瘤细胞即使不经治疗也可以发生自发性凋亡,与文献^[4]一致,但凋亡出现时间较外放疗和内放疗晚,而且凋亡指数较小。有学者认为,放疗反应与凋亡本底水平具有相关性,因此,治疗前通过组织活检,检测凋亡水平,一般认为,具有较高凋亡水平的肿瘤要比具有较低凋亡水平的肿瘤对放疗敏感。本实验中可以看到,小鼠纤维肉瘤细胞自发性凋亡水平较低,故可推测,小鼠纤维肉瘤细胞对放疗敏感性较差。

(2) 外照射治疗可以诱导纤维肉瘤细胞凋亡,在照射后 6 h 即可发生凋亡,凋亡出现较早,随着时间推移,细胞凋亡指数有所增加。

(3) ¹²⁵ 粒子植入内照射治疗可以诱导纤维肉瘤细胞发生凋亡。¹²⁵ 粒子植入治疗是指通过一定方法将封装好的具有一定规格、活度的微型放射源¹²⁵ 引入体内肿瘤靶区,通过其衰变释放出射线杀伤肿瘤细胞,¹²⁵ 粒子半衰期较长,能量较低,在组织中有足够的穿透力,易制成微粒源等特点,适于生长缓慢肿物的永久植入治疗^[5],本实验将¹²⁵ 粒子直接用特制长穿刺针插进小鼠瘤体内进行内放射治疗。

表 2 中显示,1 个粒子内照射组,在植入第 4 d 时凋亡指数较高,明显高于对照组($P < 0.05$),而第 8 d 时,凋亡指数反而有所下降。有文献报道^[6,7],放射诱导的凋亡指数达到峰值的时间因细胞系类型不同而不同,与受照射剂量无关,故可认为小鼠纤维肉瘤细胞凋亡指数达峰值时间在 4 d 左右。

2 个粒子内照射组,凋亡指数同样在第 4 d 时最高,第 8 d 时有所下降,与 1 个粒子内照射组比较,4、8 d 时 P 均 < 0.05 ,说明随着植入粒子数增多,照射剂量的增加,小鼠纤维肉瘤细胞的凋亡指数也随之增加,但凋亡指数达峰值的时间没有随照射剂量增加而改变,且随着粒子数增多,照射剂量增多,凋亡指数也随之增加,疗效显著。

(4) p53 基因有野生型和突变性之分,野生型 p53 半衰期仅 6 ~ 20 min,而突变型 p53 半衰期长达



数小时,突变 p53 具有癌蛋白活性,且稳定性增高,通过免疫组化检出。p53 基因对细胞凋亡有调控作用,野生型 p53 基因编码的 p53 蛋白对细胞凋亡有促进作用,而突变型 p53 基因编码的 p53 蛋白对细胞凋亡有抑制作用^[8]。p53 与肿瘤放射敏感性有关,野生型 p53 对食管癌、鼻咽癌有放射增敏效果,而突变型 p53 与放射抗拒有关。因此,肿瘤中 p53 的状态只能代表某些肿瘤的放射敏感性^[9,10]。在本实验中,p53 的表达均为阴性,说明突变的 p53 未参与细胞凋亡的调控,S180 的放射敏感性与突变型 p53 的状态无关。

综上所述,¹²⁵I 粒子植入内照射可以诱导纤维肉瘤 S180 瘤株细胞凋亡,是其治疗肿瘤的机制之一,其诱导细胞凋亡的机制与突变型 p53 基因状态无关,适用于多种肿瘤,加之可以使肿瘤靶区高剂量,而周围正常组织损伤小,按病灶形态植入,持续性照射治疗,创伤小,不会产生放射泄露,操作简便等特点,使其临床应用显示了广阔的前景。

参考文献:

[1] 于世平. 肿瘤放射治疗物理学进展[M]. 北京:北京医科大学出版社,2003,(3):187.
 [2] 邢春根,吴锦昌,金留根. ¹⁸⁸Re-C50 对结肠癌细胞的凋亡诱导作用[J]. 中华核医学杂志,2004,24(2):101-102.
 [3] Yamagnchi A, Kurosaka Y, Fushida S, et al. Expression of P53 protein in colored cancer and its relationship to short-term prognosis[J]. Cancer, 1992, 70(12):2778-2784.
 [4] Olive PL, Durand. Apoptosis: An indicator of radiosensitivity in vitro[J]. Int J Radat Biol, 1997, 71(6):695-707.
 [5] 法逸华. ¹²⁵I 粒子近距离照射在肿瘤治疗中的作用[J]. 国外医学放射医学核医学分册, 2003, 27(3):115-117.
 [6] Radford IR, Marphy TK, Radley JM, et al. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part 2: apoptotic death is shown by all lines examined[J]. Int J Radiat Biol, 1994, 64(4):217-222.
 [7] 张春智. 放射治疗诱导肿瘤细胞凋亡的近期研究动态[J]. 国外医学,放射医学核医学分册, 2004, 28(6):281-283.
 [8] Lane DP, Lu X, Hupp T, et al. The role of the p53 protein in the apoptosis response[J]. Philos Trans R Soc Lond Biol Sci, 1994, 345(6):277-280.
 [9] 高献书,卢付河,周志国,等. p53 基因对食管癌细胞的作用[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2002, 11(1):34-36.
 [10] Bae I, Smith ML, Sheikh MS, et al. An abnormality in the P53 pathway following irradiation in many wild type P53 human melanoma lines[J]. Cancer Res, 1996, 56(4):840-847.

[编辑:贺文;校对:杨卉]

欢迎订阅 2008 年《循证医学》杂志

《循证医学》是经国家新闻出版署批准,广东省卫生厅主管,由广东省循证医学研究中心、广东省人民医院和中山大学附属第三医院主办的医学学术期刊。2003 年被评为“《CNKI 中国期刊全文数据库》(CJFD)”、“万方数据-数字化期刊群”全文收录期刊,“中国学术期刊综合评价数据库”统计源期刊(CAJCED)、《中国科学引文数据库》(CSCD)、《中国生物医学文献数据库》(CBMdisc)、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》(CMCC)、《中文科技期刊数据库》来源期刊;2004 年 3 月被中国科学技术信息研究所评定为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”;2005 年 5 月荣获首届《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊奖。

主编吴一龙(广东省人民医院副院长、广东省人民医院肿瘤中心主任、广东省肺癌研究所所长、广东省循证医学研究中心主任,中山大学肿瘤学教授,博士生导师)。本刊以广大医药卫生技术人员和医疗、教学、科研管理工作者为读者对象,立足临床医学,介绍循证医学(evidence-based medicine, EBM)的理念、方法及相关知识,探讨符合中国国情的循证医学实践,促进国内外医学学术交流和医学科学发展。

本刊以临床实践指导性为特色,设置的主要栏目有:快讯、述评、循证评价、论著(包括诊断性研究、疗效研究、病因学研究、疾病的预后研究等)、Cochrane 研究方案、证据的寻求与评价、循证医学中的医学统计学问题、循证医学理论方法研究、综述与讲座、教育与争鸣、循证医学在线、临床指引与共识等。诚挚欢迎投稿。

《循证医学》杂志的国际标准刊号:ISSN 1671-5144,国内统一刊号:CN 44-1548,双月刊,大 16 开本,64 页,国内定价每期 10 元,全年 60 元。欲订阅者请从全国各地邮局订购,邮发代号 46-326,也可直接从本刊编辑部邮购。

地址:广州市中山二路 106 号 广东省人民医院《循证医学》编辑部(510080)

电话:020-83844620,020-83827812-51482;传真:020-83844620

网址:www.jebm.cn; E-mail: xzyxzz@163.net