

DHEA 联合 γ 射线对食管癌 EC109 细胞移植裸鼠的 抑瘤与抗辐射作用

杜利清 孟爱民 王月英 吴红英 张恒 王彦 刘强 李德冠 王小春 路璐

(中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所天津市分子核医学重点实验室 天津 300192)

摘要 观察 DHEA (17 α -D-高炔雌二醇-3-乙酯) 联合 ^{137}Cs γ 射线辐照对 EC109 移植小鼠肿瘤的抑制作用及放疗后对荷瘤小鼠造血系统的防护作用。将接种食管癌细胞系 EC109 的裸鼠按照处理方式的不同分为对照组、单照组、DHEA 组和 DHEA 联合辐照组, 给药组连续给药 9 d, 12 d 后分别检测肿瘤抑制率、外周血细胞数、骨髓有核细胞数等指标。结果表明, DHEA 组抑瘤率明显高于对照组, DHEA 联合辐照组的瘤重分别低于单照组和对照组, 具有统计学差异 ($p < 0.01$)。DHEA 联合辐照组的红细胞、血红蛋白均高于对照组及单照组, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。提示 DHEA 联合 γ 射线辐照对食管癌移植小鼠肿瘤具有显著的协同抗瘤效果, DHEA 对辐照后荷瘤小鼠造血系统具有一定的防护作用。

关键词 食管癌, DHEA, γ 射线, BALB/c-nu 小鼠

中图分类号 R811.5, R735.1

恶性肿瘤的治疗主要包括手术及放、化疗, 而放、化疗主要副作用是抑制免疫及造血功能。DHEA (17 α -D-高炔雌二醇-3-乙酯) 是一种新型辐射防护剂, 前期的药效学研究表明, DHEA (又名 E838) 对小鼠的肝癌^[1]、肺癌^[2]、淋巴瘤^[3]等均有明显的抑制作用, 本实验按照国家一类新药报批要求, 通过建立食管癌细胞移植小鼠模型, 探讨单独使用 DHEA 及联合 γ 射线对食管癌的抑瘤增效作用, 及 DHEA 对照射后食管癌荷瘤小鼠造血系统的防护作用, 为其用于肿瘤治疗提供实验依据。

1 实验材料和方法

1.1 动物和细胞系

BALB/c-nu 裸鼠 20 只, 8-12 周龄, 雄性, 体重 20-22 g, 由中国医学科学院动物所提供, 许可证号: SCXK (2009-0004), 饲料为清洁级全价鼠料, 由北京科奥协力饲料有限公司提供。EC901 食管癌细胞系由天津医科大学提供。

1.2 药物和仪器

DHEA 是本所合成的雌激素类辐射防护剂, 白

色粉末, 无味。LM2235, Leica 切片机 (德国); BX51, 奥林巴斯显微镜 (BX51 日本); Sysmex poch-100i 全自动血液分析仪 (日本); 电子天平 (梅特勒一托利多仪器有限公司)。 ^{137}Cs γ 射线辐照源, 加拿大原子能有限公司, 型号 USD, Autocell40, 照射剂量为 2 Gy, 剂量率为 0.75 Gy/min。

1.3 EC109 荷瘤小鼠模型的建立

EC109 细胞生长至亚融合状态时收集细胞, 用生理盐水调整细胞数为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 取 0.1 mL 接种于每只小鼠右侧腋窝下, 计为实验第 1 天。

1.4 分组及给药

实验第 3 天, 将接种肿瘤的裸鼠随机分为对照组、单照组、DHEA 组 (7.5 mg/kg 剂量) 和 DHEA 联合辐照组, 每组 5 只。DHEA 组、DHEA 联合辐照组腹腔注射给药剂量 0.2 mL/只, 1 次/d, 连续 9 d, 单照组及 DHEA 联合辐照组分别于实验第 4 天和第 8 天对肿瘤局部给予 2 Gy 照射。

1.5 检测指标

1.5.1 肿瘤抑瘤率 实验第 12 天, 处死实验小鼠,

国家 973 重大专项 (2011CB964800-G)、国家自然科学基金 (81072237、81102873、81129020)、教育部高等学校博士学科点专项基金 (20111106110038)、天津自然科学基金 (12JCQNJC09100、11JCZDJC19100) 和中国医学科学院放射医学研究所发展基金 (SF1208) 资助

第一作者: 杜利清, 女, 1973 年 6 月出生, 2009 年于北京协和医学院获博士学位, 放射医学专业, 副研究员

通讯作者: 王月英, E-mail: wyytj@yahoo.com.cn

收稿日期: 初稿 2012-06-25, 修回 2012-09-15

取瘤体称重, 计算抑瘤率: 抑瘤率(%)=(1-治疗组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100%

1.5.2 骨髓有核细胞数 处死小鼠后, 取一侧股骨, 用白细胞稀释液冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞制成悬液, 全自动血液分析仪计数骨髓有核细胞数。

1.5.3 外周血细胞计数 实验第12天, 将各组小鼠眼球摘除采血, 全自动血液分析仪计数血细胞数。

1.5.4 病理学 HE 染色 取小鼠肿瘤组织, 常规固定、脱水、脱钙、石蜡包埋, 石蜡块用石蜡切片机制作 5 μm 切片, 切片 HE 染色后用中性树脂封片, 用正置显微镜进行组织学观察并采集图像。

1.6 统计学处理

数据统计结果用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组数据间用 t 检验, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

Table 1 Influence of DHEA combined with γ -rays on esophageal bearing mice

Group	Initial weight / g	Final weight / g	Tumor weight / g	Gain / g	Inhibited rate / %
Control	21.93±1.42	23.58±1.48	0.87±0.17	0.78±0.58	0
Radiation	21.28±1.48	23.78±0.91	0.67±0.32	1.83±1.01*	22.99
DHEA	20.53±1.75	26.43±1.68	0.32±0.19**	5.58±2.11**▲▲	63.22
DHEA+ γ -rays	20.50±1.37	23.13±0.92	0.27±0.22**▲	2.36±1.77	68.97

Note: Versus control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; versus radiation group, ▲ $p < 0.05$, ▲▲ $p < 0.01$.

2.2 移植肿瘤病理分析

食管癌 EC109 实验肿瘤组织的 HE 染色切片见图 1。对照组肿瘤形态不一, 缺乏规则的结构特征。肿瘤无包膜, 与正常组织细胞无明显界限, 呈浸润

2 结果

2.1 DHEA 对 EC109 移植瘤生长的抑制作用

DHEA 及 DHEA 联合辐照组瘤重均显著低于对照组 ($p < 0.01$); DHEA 联合辐照组瘤重较单照射组轻, 有统计学意义 ($p < 0.05$); DHEA 治疗组瘤重也明显高于 DHEA 联合辐照组, 但统计学显示无差异。DHEA 组裸鼠净增重与对照组及单照射组比较, 差异有统计学意义 ($p < 0.01$); DHEA 联合照射组裸鼠净增重由于标准差偏大, 较 DHEA 及单照射组均无统计学差异, 需加大样本量进一步证实。DHEA 及 DHEA 联合辐照组对食管癌 EC109 的生长均有抑制作用, 抑瘤率分别为 63.22% 和 68.97%。表明 DHEA 联合辐照可显著提高抑瘤作用, 具体见表 1。

性生长。肿瘤细胞的强嗜碱性蓝染, 呈典型的恶性特征, 瘤细胞大小形态各异排列紊乱, 核浆比值增大, 核异型明显, 中-低分化, 见核分裂相, 核仁可见 (图 1A)。

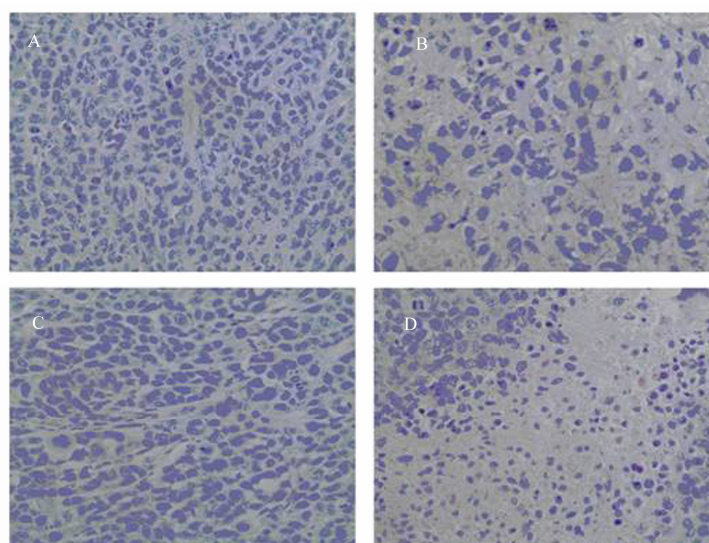


Fig.1 Pathological changes of xenografts in control group(A), DHEA treatment group(B), radiation group(C), and DHEA with radiation treatment group(D)

单照组肿瘤形态不规则,肿瘤细胞异型性明显,瘤内有组织细胞机化,肿瘤无包膜,但与正常组织界限明显。肿瘤有片状坏死,瘤细胞凋亡多见,核分裂像少见(图 1B)。这表明, γ 射线可促进肿瘤细胞凋亡,使肿瘤生长局限化。

而 DHEA 处理后的食管癌组织细胞坏死较单照组明显增多,且存在组织细胞机化。与正常组织细胞界限明显。核浆比值增大核分裂相少见,核仁少见(图 1C)。

DHEA 联合辐照组肿瘤细胞生长有明显被抑制的形态学性,表现为肿瘤形态规则,瘤内有组织细胞,肿瘤有包膜,与正常组织细胞界限明显。瘤细胞大小形态较规则,核浆比值增大,少见核分裂相,高-中分化,核仁少见(图 1D)。

2.3 DHEA 对食管癌荷瘤小鼠外周血细胞及骨髓有核细胞的影响

实验第 12 天后,与对照组小鼠比较,DHEA 及 DHEA 联合辐照组的骨髓有核细胞数均高于对照组及照射组,与对照组及照射组比较差异有统计学意义($p<0.05$),并能够明显升高小鼠外周血白细胞、红细胞、血红蛋白和血小板的数量,DHEA 组、DHEA 联合辐照组白细胞数与单照组比较,差异有统计学意义,DHEA 联合辐照组的红细胞与对照组及单照组比较有显著性差异,DHEA 联合辐照组的血红蛋白较对照组及单照组比较,差异均有统计学意义($p<0.01$),具体见表 2。

Table 2 Influence of DHEA combined with γ -rays on hematopoiesis of mice

Group	WBC / $10^9 L^{-1}$	RBC / $10^{12} L^{-1}$	HGB / $g \cdot L^{-1}$	PLT / $10^9 L^{-1}$	BMNC($\times 10^6$)/Femur
Control	9.87 $\pm$ 2.07	9.27 $\pm$ 0.99	14.73 $\pm$ 1.49	1284.33 $\pm$ 275.64	14.08 $\pm$ 2.20
Radiation	4.68 $\pm$ 0.98	9.73 $\pm$ 0.57	16.08 $\pm$ 1.12	1190.75 $\pm$ 113.00	9.38 $\pm$ 2.43
DHEA	10.78 $\pm$ 0.79 ^{▲▲}	10.30 $\pm$ 0.59	16.48 $\pm$ 1.12	1341.50 $\pm$ 255.21	18.25 $\pm$ 1.71 ^{*▲▲}
DHEA+ γ ray	10.25 $\pm$ 4.25 [▲]	12.25 $\pm$ 0.96 ^{*▲▲}	20.40 $\pm$ 1.00 ^{**▲▲}	1502.25 $\pm$ 70.01	19.31 $\pm$ 0.50 ^{**▲▲}

Note: versus control group, * $p<0.05$, ** $p<0.01$; versus radiation group, [▲] $p<0.05$, ^{▲▲} $p<0.01$.

3 讨论

近年来随着肿瘤放射治疗的进展和核工业的迅速发展,国内外对辐射防护剂的研究热情重新高涨,现有抗辐射损伤药物,如雌激素类衍生物,效果明显,但毒性较大,实际使用受限制^[4,5]。有目的地寻找毒性低、疗效高的抗辐射新药,是当今辐射防护剂的研究热点^[5]。

DHEA 是我所研制的炔雌醇的衍生物,经过 20 多年的研究证实,其对由辐射引起的造血组织损伤具有预防和治疗的作用^[6]。本研究以食管癌荷瘤小鼠为模型,观察了 DHEA 对放疗后小鼠造血功能的影响。结果显示,DHEA 能提高食管癌荷瘤小鼠的白细胞、红细胞、血小板和骨髓有核细胞的数量,表明 DHEA 可以改善放疗后荷瘤小鼠的造血功能。

食管癌是常见的世界十大恶性肿瘤之一,而中国是世界上食管癌高发区,发病率和病死率均居世界之首,每年全世界新诊断出的 30 万食管癌患者中,二分之一以上发生在中国地区,而放射治疗是食管癌的主要治疗手段之一^[7]。为了进一步观察 DHEA 对食管癌放疗效果的影响,本实验利用荷瘤的 BALB/c-nu 小鼠作为肿瘤模型,观察 DHEA 单独用药及联合放疗的抑瘤作用。结果证明,DHEA 能显著增加荷瘤小鼠 EC109 食管癌的放射治疗效果,

明显抑制荷瘤小鼠 EC109 食管癌的生长,肿瘤生长速度明显减慢,瘤重明显减轻。当 DHEA 与放疗联合应用时,抑瘤率为 68.97%,高于单照组和 DHEA 组(63.22%),表明其具有良好的协同抗癌效果。进一步观察移植瘤病理结构发现,DHEA 组及 DHEA 联合照射组移植瘤组织与周围正常组织细胞界限明显,细胞分化程度较单照组及对照组明显增高,提示 DHEA 联合辐照对食管癌移植小鼠肿瘤具有显著的协同抗癌效果。

以上结果表明,DHEA 除了具有改善荷瘤小鼠造血功能的作用外,还对食管癌细胞的生长有抑制作用外,DHEA 联合照射对食管癌移植小鼠肿瘤具有显著的协同抗癌效果。

参考文献

1 吴红英,王月英,李德冠,等. E838 联合 γ 射线对小鼠肝癌 H22 抑瘤作用的研究[J],中国辐射卫生,2008,17(4): 387-389
WU Hongying, WANG Yueying, LI Deguan, *et al.* Effects of E838 in combination with γ -rays on H22 hepatocellular carcinoma cells of mice[J]. Chinese Journal of Radiological Health, 2008, 17(4): 387-389
2 王月英,王小春,吴红英,等. 17 α α -D-高炔雌二醇-3-乙酯联合 γ 射线照射对不同品系小鼠的抑瘤作用. 国际

- 放射医学核医学杂志[J], 2012, **36**(2): 95-98
- WANG Yueying, Wang Xiaochun, WU Hongying, *et al.* Inhibitory effects of 17 α -D-homo ethynylestradiol-3-acetate combined with γ -rays irradiation on adenocarcinoma of the lung in different mice strains [J]. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine, 2012, **36**(2): 95-98
- 3 王月英, 李德冠, 吴红英, 等. E838 及其联合放疗对 IRM-2 小鼠自发淋巴瘤的抑制作用[J]. 中国生化药物杂志, 2010, **31**(3): 29-32
- WANG Yueying, LI Deguan, WU Hongying, *et al.* Inhibitive effects of E838 combined radiotherapy and chemotherapy on malignant tumor in IRM-2 mice [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutic, 2010, **31**(3): 29-32
- 4 徐冰心, 肖成荣, 郑思新, 等. 辐射防护剂研究进展. 中华放射医学与防护杂志[J], 2002, **22**(11): 64-67
- XU Bingxin, XIAO Chengrong, ZHENG Sixin, *et al.* Progress in radiation protective agents study [J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2002, **22**(11): 64-67
- 5 Henderson M A, Valluri S, Garrett J, *et al.* Effects of estrogen and gender on cataractogenesis induced by high-LET radiation. Radiation Research, 2010, **173**(2): 191-196
- 6 王月英, 王汝勤, 赵忠萍. E838 对小鼠辐射防护作用的观察[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2005, **24**(1): 39-40
- WANG Yueying, WANG Ruqin, ZHAO Zhongping. Radiation protective effects of four kinds of estrogens on mice [J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2005, **24**(1): 39-40
- 7 王小春, 刘金剑, 王月英, 等. SKP2 表达对食管癌细胞辐射敏感性的影响[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2012, **36**(2): 103-106
- WANG Xiaochun, LIU Jinjian, WANG Yueying, *et al.* Effects of SKP2 expression on radio-sensitivity of esophageal carcinoma [J]. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine, 2012, **36**(2): 103-106

The antitumor effect of DHEA combined with γ -rays on human esophageal transplanted carcinoma in nude mice

DU Liqing MENG Aimin WANG Yueying WU Hongying ZHANG Heng WANG Yan
LIU Qiang LI Deguan WANG Xiaochun LU Lu

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College,
Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT The antitumor effect of 17 α -D-homo ethynylestradiol-3-acetate (DHEA) combined with γ -rays and protective effect of DHEA on hematopoietic function in tumor-bearing mice was studied in this paper. The EC109-inoculated nude mice were divided into four treatment groups as DHEA, DHEA combined with γ -rays, γ -rays only, and control group. The groups with DHEA were continuously delivered drugs for 9 days, and the inhibition rate of tumor, blood count, and nucleated cell in bone marrow were examined 12 days later. The results showed that inhibition rate of tumor in DHEA group increased compared with that of control group; the tumor weight of the irradiated group was lighter than that of DHEA combined with γ -rays group ($p < 0.01$). In DHEA combined with γ -rays group, RBC and Hb were significantly increased compared with that in radiation group. DHEA and γ -rays have synergic effect in inhibiting esophageal cancer growth and DHEA can protect hematopoietic function in radiation-injured mice.

KEYWORDS Esophageal cancer, DHEA, γ -rays, BALB/c nude mice

CLC R811.5, R735.1