

泰索帝对 Lewis 肺癌放疗增敏作用的实验研究

任振义 白春学 洪群英 曾昭冲

(复旦大学附属中山医院呼吸病研究所 上海 200032)

金一尊

(复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 研究了泰索帝(docetaxel)对荷 Lewis 肺癌 C57BL 小鼠的放疗增敏作用。给荷 Lewis 肺癌 C57BL 小鼠腹腔注射不同剂量的泰索帝 12h 或 48h 后进行 10Gy 局部照射。结果表明,经过泰索帝放疗增敏治疗后肿瘤生长相对速率明显减慢,4 个放疗增敏组 q 值在 1.21—1.38 之间。研究还显示泰索帝的放疗增敏作用机制是通过将大量增殖期细胞阻滞在 G_2 和 M 期以及诱导细胞凋亡。本实验提示泰索帝作为放疗增敏剂应用于肺癌的治疗,既发挥了化疗作用,又具有放疗增敏作用,是很有开发潜力的抗肿瘤药物。

关键词 泰索帝, 放疗增敏, Lewis 肺癌

中图分类号 R730.5

泰索帝是泰素类抗肿瘤药物,在体外对多种细胞系显示出细胞毒性作用,可以直接诱导细胞凋亡,已作为抗肿瘤药物用于临床对常见肿瘤(包括肺癌)的治疗^[1]。本工作研究泰索帝的放疗增敏作用和放疗增敏机制,以期为临床治疗提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验选用 C57BL 小鼠,6—8 周龄,体重 20 ± 2 g,雄性,由中国科学院动物中心提供。

1.2 实验药品

泰索帝 20mg/瓶,由安万特公司提供。用时加无水乙醇 1.5mL、5%葡萄糖溶液 6.5mL,配成终浓度为 2.5mg/mL 的应用液。

1.3 照射

将荷瘤小鼠固定在特制装置上,以铅板屏蔽除右下肢以外的部位,以¹³⁷Cs γ 射线(γ II 40,加拿大产)为照射源,照射剂量率为 0.93 Gy/min,对放疗组和各增敏组荷瘤小鼠右下肢肿瘤进行局部照射。

1.4 Lewis 肺癌细胞的体外培养和荷瘤小鼠模型的制备

将 Lewis 肺癌细胞在含有 20%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中培养后,制成细胞含量为 10^7 /mL 的细胞悬液,在小鼠右下肢皮下注入 0.2mL,待瘤体直径长至 1—1.5cm 后处死荷瘤小鼠,在无菌状态下剥离出肿瘤组织,以 1:10 比例加入生理盐水后机械研磨制成细胞悬液。给每只小鼠右下肢皮下注射 0.3mL 细胞悬液,待 4d 后小鼠右下肢肿瘤体积生长至 100mm^3 — 150mm^3 即用于实验。

第一作者:任振义,男,1962 年 4 月出生,1991 年毕业于北京医科大学并获得硕士学位,内科学副教授,现为复旦大学附属中山医院攻读内科学博士学位

收稿日期:初稿 2001—12—18, 修回 2002—02—04

1.5 泰索帝对在体 Lewis 肺癌细胞周期影响的测定

选择荷瘤小鼠 21 只,随机分成 7 组,每组 3 只。给所有荷瘤小鼠腹腔注射泰索帝 $207\text{mg}/\text{m}^2$,分别于用药前(对照组)和用药后 6、12、18、24、48、72h 各处死 1 组荷瘤小鼠,取出肿瘤组织,常规固定、切片、HE 染色,每只荷瘤小鼠肿瘤组织切片计数 300 个细胞,计算出 G_2 和 M 期细胞占总细胞数的百分比。

1.6 泰索帝诱导在体 Lewis 肺癌细胞凋亡的测定

将荷瘤小鼠分成 3 组,1 组用于对照,另外两组腹腔注射泰索帝 $207\text{mg}/\text{m}^2$,将对照组和用药后 12、48h 动物处死,取出肿瘤组织,常规固定、切片,根据文献[2]的方法进行原位末端标记(TUNEL)染色,观察细胞凋亡情况。

1.7 泰索帝放疗增敏的实验研究

1.7.1 将荷瘤小鼠随机分成 8 组,每组 6 只,进行如下处理

(1) 对照组:腹腔注射 5%葡萄糖 0.4mL,注射泰索帝的剂量以小鼠体表面积计算;(2) 放疗组:肿瘤处局部照射 10Gy;(3) 泰索帝组 A:腹腔注射泰索帝 $82.8\text{mg}/\text{m}^2$;(4) 泰索帝组 B:腹腔注射泰索帝 $207\text{mg}/\text{m}^2$;(5) 增敏组 A:腹腔注射泰索帝 $82.8\text{mg}/\text{m}^2$,12h 后肿瘤处局部照射 10Gy;(6) 增敏组 B:腹腔注射泰索帝 $207\text{mg}/\text{m}^2$,12h 后肿瘤处局部照射 10Gy;(7) 增敏组 C:腹腔注射泰索帝 $82.8\text{mg}/\text{m}^2$,48h 后肿瘤处局部照射 10Gy;(8) 增敏组 D:腹腔注射泰索帝 $207\text{mg}/\text{m}^2$,48h 后肿瘤处局部照射 10Gy。

1.8 评价指标

1.8.1 肿瘤体积 按照上述分组处理后,每 2d 测量肿瘤最长径 a 值和最短径 b 值,根据公式 $v=ab^2\pi/6$ 计算肿瘤体积。

1.8.2 泰索帝对 Lewis 肺癌细胞周期影响 以每组动物肿瘤组织切片中 G_2 和 M 期细胞占总细胞数的百分比的平均值,确定为该时间点 G_2 和 M 期细胞占总细胞数的百分比,各组与对照组比较用 t 检验。

1.8.3 泰索帝诱导在体 Lewis 肺癌细胞凋亡 切片经过 TUNEL 染色后,在光镜下比较对照组和用药后不同时间 Lewis 肺癌组织内的细胞凋亡情况。

1.8.4 生长时间 肿瘤体积生长到实验开始体积的 10 倍所用的时间。

1.8.5 生长延缓时间 各实验组肿瘤的生长时间减去对照组的生长时间。

1.8.6 相对生长速率 实验结束时肿瘤体积与实验开始体积的比值,实验数据用 t 检验。

1.8.7 生长抑制率和 q 值 以公式:生长抑制率 = $1 - \text{实验组体积} / \text{对照组体积}$ 计算各实验组对肿瘤的生长抑制率,以公式 $q = E_{(A+B)} / (E_A + E_B - E_A \times E_B)$ 计算是否有增敏作用,其中 $E_{(A+B)}$ 表示各放疗增敏组对肿瘤的生长抑制率, E_A 、 E_B 分别表示放疗组、泰索帝组对肿瘤的生长抑制率。 q 值 >1 说明有增敏作用, q 值 $=1$ 说明有相加作用, q 值 <1 说明有拮抗作用。

2 实验结果

2.1 泰索帝对在体 Lewis 肺癌细胞周期的影响

在腹腔注射泰索帝 $207\text{mg}/\text{m}^2$ 后 6h, Lewis 肺癌组织内 G_2 和 M 期细胞占总细胞数的比例已经升高,至 12h 达最高值,与对照组比较有显著性差异。12h 后逐渐下降,在 48h 后接近对照组。给予泰索帝后不同时间点 Lewis 肺癌组织内 G_2 和 M 期细胞占总细胞数比例(见表 1)。

Tab.1 The percentage of G₂ and M phase cells at different time after docetaxel administration/%

Time/h	Control	6	12	18	24	48	72
Percentage of G ₂ and M phase cells	1.5	22.6 ⁽¹⁾	31.9 ⁽¹⁾	16.0 ⁽²⁾	6.3 ⁽²⁾	3.6 ⁽²⁾	1.3
s	0.26	2.8	2.9	2.8	1.5	0.6	0.2

⁽¹⁾ $p < 0.01$, ⁽²⁾ $p < 0.05$ vs control

2.2 泰索帝诱导在体 Lewis 肺癌细胞凋亡

对照组 Lewis 肺癌组织内凋亡细胞很少,给荷瘤小鼠腹腔注射 207mg/m² 泰索帝后 12h Lewis 肺癌组织内可见较多的细胞凋亡,48h 后凋亡细胞则明显减少。此时可见较多已经凋亡细胞的遗迹,对照组和给药后 12h 细胞凋亡情况(见图 1 和图 2)。

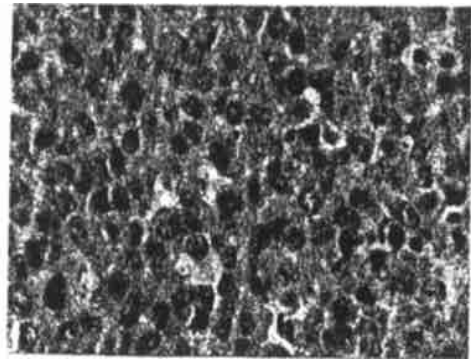


Fig.1 The morphological feature in lewis lung cancer tissue in control group

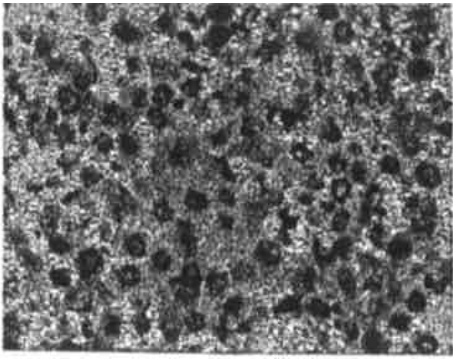


Fig.2 Apoptotic cells in lewis lung cancer tissue 12h after 207mg/m² docetaxel administration

2.3 肿瘤体积的变化

图 3 为各组肿瘤体积随着时间的增长趋势。从图 3 中可以看出,经过泰索帝合并放射治疗后,各组肿瘤生长均慢于对照组、放疗组和泰索帝组。

2.4 肿瘤生长延缓时间、相对生长速率、生长抑制率和 q 值

各组肿瘤生长延缓时间、相对生长速率、生长抑制率和 q 值(见表 2)。与对照组、泰索帝组和单纯放疗组比较,4 个放疗增敏组肿瘤生长延缓时间和生长抑制率均有不同程度的增加,

Tab.2 Tumor growth parmeters in different groups

Groups	Relative growth rate	Growth delay	Inhibition rate	q value
Control	31.86±7.88			
Docetaxel A	28.11±7.75	2.27	0.21	
Docetaxel B	26.33±10.30	3.44	0.25	
Radiation	26.93±10.30	3.69	0.27	
Doc A+Rad ₁₂	17.21±3.18 ⁽²⁾⁽³⁾	6.89	0.51	1.21
Doc B+Rad ₁₂	14.70±3.15 ⁽²⁾⁽⁴⁾	8.67	0.58	1.29
Doc A+Rad ₄₈	17.20±5.6 ⁽¹⁾⁽³⁾	6.99	0.53	1.26
Doc B+Rad ₄₈	13.77±2.60 ⁽²⁾⁽⁴⁾	9.86	0.62	1.38

$n=6$, ⁽¹⁾ $p < 0.05$ vs radiation, ⁽²⁾ $p < 0.01$ vs radiation, ⁽³⁾ $p < 0.05$ vs docetaxel A,

⁽⁴⁾ $p < 0.05$ vs docetaxel B, Rad₁₂ and Rad₄₈ represent radiation carried out 12 and 48h

after administration of docetaxel respectively

相对生长速率也减慢。其中,高剂量泰索帝合并放疗组的生长延缓时间、生长抑制率均大于低剂量泰索帝合并放疗组。各放疗增敏组的 q 值在 1.21—1.38 之间。这些结果表明,泰索帝具有一定的放疗增敏作用。

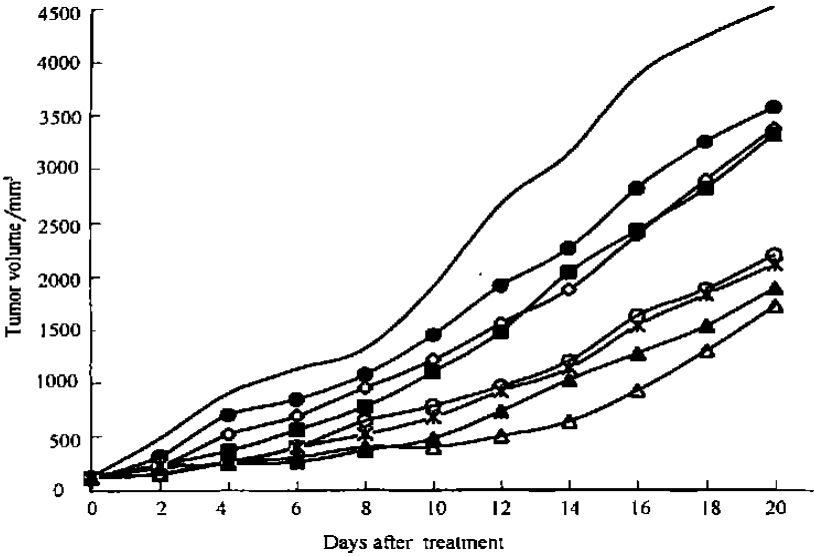


Fig.3 Tumor Growth Curves for different groups.
— · Control, ● · Docetaxel 82.8mg/m², ◇ · Docetaxel 207mg/m², ■ · Radiation alone,
○ · Docetaxel 82.8mg/m²+Radiation/12h, * · Docetaxel 82.8mg/m²+Radiation/48h,
▲ · Docetaxel 207mg/m²+ Radiation/12h, △ · Docetaxel 207mg/m²+ Radiation/48h

3 讨论

临床研究证实,化疗与放疗同步进行的疗效优于化疗—放疗序贯进行的疗效。同步放化疗可增强对肿瘤的杀伤,缩短总疗程,减少在放化疗过程中肿瘤细胞的加速再增殖。化疗药物在此过程中既有全身治疗作用,可能也有放疗增敏作用^[3,4]。泰索帝与放疗联合是最近进入临床研究的,研究表明,泰索帝比以往的化疗药物具有更显著的效果,但其作用机制尚未完全明了。本研究以泰索帝和放疗联合治疗 Lewis 肺癌,于放疗前 12 或 48h 分别给予两个剂量的泰索帝,结果表明,泰索帝对 Lewis 肺癌具有放疗增敏作用。

实验中选择的泰索帝剂量是根据泰索帝的 LD₅₀ 设计的,低剂量组选择的是 LD₅₀ 的 1/5,高剂量组选择的是 LD₅₀ 的 1/2。通过研究泰索帝对在体 Lewis 肺癌细胞周期的影响发现,使用泰索帝 12h 以内 G₂ 和 M 期细胞不断增多,于 12h 达到高峰,这是我们选择给药后 12h 这个时间点进行照射的依据。结果发现,在这个时间点进行照射,高低两个剂量的泰索帝均有放疗增敏作用。关于泰索帝放疗增敏的机理,目前认为与泰索帝对细胞增殖周期的影响有关。放射生物学研究表明,处于增殖周期不同时相的细胞放射敏感性不同,其中 M 期细胞对电离辐射最敏感,小剂量照射即可引起细胞即刻死亡或染色体畸变,导致下一次核分裂时子代细胞的死亡。在分裂间期各个时相中, G₂ 期最敏感,其次是 G₁ 期,而 S 期最不敏感, G₀ 期细胞因为乏氧和修复时间充足而表现为抗辐射性。本研究表明,使用泰索帝后可以使大量增殖期肿瘤细胞阻滞于 M 和 G₂ 期,此时照射能够最大程度地杀伤肿瘤细胞,从而达到放射增敏的目的。

根据文献[5,6]报道,泰索帝能够选择性地与微管蛋白 β 亚基 N-末端第 31 位氨基酸结合,促进微管蛋白聚合成稳定的微管并且抑制微管解聚。从而形成稳定的微管束,破坏微管系统的正常平衡,导致细胞有丝分裂的阻滞,将增殖期的肿瘤细胞阻滞在 G_2 和 M 期。

本研究还选择了给药后 48h 照射,两个剂量的泰索帝均有放疗增敏作用,与 Mason 等^[7]放疗增敏治疗乳腺癌的实验结果一致,这显然还存在其它的放疗增敏机制。研究提示,泰索帝本身为化疗药物,用药后可以诱导敏感细胞凋亡,这在泰索帝诱导在体 Lewis 肺癌细胞凋亡中已经得到证实。使用泰索帝后 12h Lewis 肺癌组织内可见较多的细胞凋亡。48h 后凋亡细胞少见,但可见较多已经凋亡细胞的遗迹,这表明泰索帝诱导的大量细胞凋亡已经结束。此时 Lewis 肺癌组织内由于部分细胞凋亡,一方面减少了氧的消耗,另一方面缩短了乏氧细胞与供养血管间的距离,照射区内血流增加,改善了局部供氧状态,原来乏氧的细胞再氧合,所以放射敏感性提高^[8]。

本研究还发现,高剂量泰索帝的增敏作用大于低剂量泰索帝的增敏作用;另外,在使用相同剂量泰索帝的前提下,用药 48h 后照射较用药 12h 后照射的放疗增敏作用大。这说明泰索帝的放疗增敏作用存在着剂量和时间依赖性。

本研究证实泰索帝通过影响细胞增殖周期和诱导细胞凋亡来发挥放疗增敏作用,对 Lewis 肺癌有较好的治疗效果,为临床上使用泰索帝放疗增敏治疗肺癌提供了实验依据。泰索帝在临床上与放疗同步治疗肺癌,即发挥了化疗作用,又具有放疗增敏作用,使放化疗的联合更加优化,是很有开发潜力的抗肿瘤药物。

参 考 文 献

- 1 Choy H. *Int J Cancer*, 2000, **90**(3):113—127
- 2 黄培堂. 细胞实验指南, 北京:科学出版社,2001, 110—111
HUANG P T. *Cells: A laboratory manual*, Beijing: Science Press, 2001, 110—111
- 3 Wu H G, Bang Y J, Choi E K *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002, **52**(1):75—80
- 4 沈文江,徐国镇. 放射肿瘤学新进展, 北京:中国医药科技出版社,2001, 116—117
SHENG W J, XIU G Z. *Progress in radiation oncology*, Beijing:Chinese Medical and Pharmaceutical Science Press, 2001, 116—117
- 5 Mason K A, Kishi K, Hunter N *et al.* *Clin Cancer Res*, 1999, **5**(12):4191—4198
- 6 Pradier O, Rave Frank M, Lehmann J *et al.* *Int J Cancer*, 2001, **91**(6):840—845
- 7 Mason K A, Hunter N R, Milas M *et al.* *Clin Can Res*, 1997, **3**(12):2431—2438
- 8 Vanselow B, Eble M J, Rudat V *et al.* *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, **122**(6):856—862

THE RADIOSENSITIZATION OF DOCETAXEL ON LEWIS LUNG CANCER IN VIVO

REN Zhenyi BAI Chunxue HONG Qunyin ZENG Zhaochong

(*Institute of Respiratory Medicine of Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032*)

JIN Yizun

(*Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032*)

ABSTRACT In this paper the radiosensitization of docetaxel on Lewis lung cancer was investigated in vivo. C57BL mice bearing Lewis lung cancer were treated with $207\text{mg}/\text{m}^2$ docetaxel to determine the ability of the drug to induce mitotic arrest and apoptosis in tumor cells. The mice bearing Lewis lung cancer in the right hind leg were locally irradiated with single dose of 10Gy ^{137}Cs γ rays using small animal irradiator. The results showed that the percentage of arrested cells increased rapidly with the time, achieving its peak of 31.9% 12h after docetaxel administration. Docetaxel also induced apoptosis within 48h. Treated by different doses of docetaxel 12 or 48h prior to irradiation, the tumors grew slowly, the growth inhibition rates of the tumors increased, and the relative growth rates decreased significantly. The q value in every radiosensitizing group ranged from 1.21 to 1.38. These results indicated that docetaxel exerted its radiosensitizing potential by the mechanism of arresting mitosis and inducing apoptosis. This study suggested that docetaxel had a high potential as a successful radiosensitizer in the clinic treatment of lung cancer.

KEYWORDS Docetaxel, Radiosensitization, Lewis lung cancer

CLC R730.5