

沙利度胺联合放射治疗对结肠癌小鼠移植瘤生长及放射敏感性的影响

赵瑾¹ 韩立杰² 赵悦² 杜鹃² 王明² 高雅丽² 李兴德²

1. 沧州市中心医院肿瘤内科, 河北 沧州 061000 ;
2. 沧州市中心医院放疗科, 河北 沧州 061000

[摘要] 背景与目的: 沙利度胺能有效增强肿瘤对放射的敏感性, 但作用机制尚不清楚。本研究探讨沙利度胺对人结肠癌小鼠移植瘤放射敏感性的影响, 并探讨其协同抑制效应的机制。方法: 建立 colon26 结肠癌移植瘤模型, 将32只小鼠随机分为对照组; 单纯沙利度胺组(T组); 单纯放疗组(R组); 沙利度胺+放疗组(T+R组); 从治疗当天开始, 隔日测量肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线, 治疗结束时测量肿瘤体积, 计算抑瘤率, 处死小鼠后剥离瘤体, 采用免疫组化法测定各组肿瘤组织微血管密度(microvessel density, MVD)。结果: 治疗第22天, 对照组、T组、R组和T+R组移植瘤平均体积分别为(4.97±1.20)cm³、(2.90±0.92)cm³、(2.66±0.88)cm³和(1.89±0.76)cm³; 肿瘤生长抑制率分别为41.7%、46.5%和61.9%, T+R组移植瘤抑瘤率明显高于其他各组(P<0.05); 与R组比较, T+R组的放射增敏率为2.27; 沙利度胺联合放射治疗能显著抑制肿瘤组织MVD生成: T+R组的平均MVD较对照组下降了46.8%, 下降程度明显高于T组(40.7%)和R组(37.7%, P<0.05); 且T+R组肿瘤组织中出现较多的坏死, 坏死细胞数明显高于对照组(P<0.05)。结论: 沙利度胺可以增强结肠癌小鼠移植瘤的放射敏感性, 其机制可能与抑制移植瘤血管的生成有关。

[关键词] 沙利度胺; 放射增敏; 微血管密度; 移植瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.03.003

中图分类号: R735.3+5 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)03-0170-05

The effect of thalidomide combined with radiation therapy on growth and radiosensitization on xenograft tumor of colonic carcinoma ZHAO Jin¹, HAN Li-jie², ZHAO Yue², DU Juan², WANG Ming², GAO Ya-li², LI Xing-de² (1.Department of Medical Oncology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou Hebei 061000, China; 2.Department of Radiation Oncology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou Hebei 061000, China)

Correspondence to: LI Xing-de E-mail: lixingde@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Thalidomide can enhance the radiation sensitivity on tumor effectively, but the mechanism of radiosensitization is still unclear. The present study aimed to investigate whether thalidomide could enhance the radiation sensitivity on colon cancer transplanted tumor of mouse, and to investigate the underlying mechanism. **Methods:** We established the model of colon26 colonic carcinoma, and the mice were divided into 4 groups: Control group, the thalidomide group, the radiotherapy group and thalidomide+radiotherapy group. From the day of treatment, tumors were measured every other day. Then, the xenograft tumor growth curve was depicted. Tumor volumes were measured in different treatment groups, then, the inhibitory rates of tumor growth were calculated. Using immunohistochemical method in to detect the expression of microvessel density (MVD) in tumor tissue. **Results:** The mean tumor volumes at day 22 were (4.97±1.20)cm³ (control group), (2.90±0.92)cm³ (T group), (2.66±0.88)cm³ (R group), and (1.89±0.76)cm³ (T+R group). The tumor inhibition rate in the combination group (61.9%) was significantly higher than the other groups (41.7%, 46.5%, P<0.05). The radiotherapy sensitization enhancement ratio of the combined treatment group was 2.27 times than in the radiotherapy group. Thalidomide combined with radiation therapy can significantly inhibit microvessel density of tumor: The decreasing MVD of T+R group, T group and R group

were respectively 46.8%, 40.7% and 37.7%, and there was statistical significance between T+R group and T group ($P<0.05$), so as between T+R group and R group. It could be found more necrotic cells in tumor of group, and there was statistical significance between T+R group and control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Thalidomide can enhance the radiosensitivity mice of colonic carcinoma, and its mechanism may be related to the inhibition of tumor angiogenesis related.

[Key words] Thalidomide; Radiosensitization; MVD; Xenograft tumor

结直肠癌是消化系统中常见的恶性肿瘤,随着居民生活水平的不断提高,其发病率逐年上升。Esteves等^[1]研究认为以手术为主的结直肠癌,术后2年内局部复发率高达80%,手术、放疗和化疗已成为结直肠癌治疗的三大支柱。目前放疗是结直肠癌的重要辅助治疗手段,然而,肿瘤细胞本身对放疗的敏感性较差。因此,寻找一种放射增敏剂是当前研究的热点。Yu等^[2]在体外实验证实,沙利度胺提高人食管癌细胞的放射敏感性与VEGF有关。但尚未见沙利度胺与结直肠癌放疗敏感性的研究。本研究利用colon26结肠癌小鼠移植瘤模型,从肿瘤血管形成的角度初步探讨其抗肿瘤机制,观察沙利度胺放射增敏作用。

1 材料和方法

1.1 主要药物和试剂

沙利度胺为Sigma公司产品;胎牛血清、胰蛋白酶和RPMI-1640培养基为美国GIBCO公司产品;CD34大鼠抗小鼠IgG单克隆抗体购于upstate公司。

1.2 主要设备仪器

放射治疗设备为德国西门子公司生产的PRIMUS-H型医用电子直线加速器(由河北医科大学第三医院提供),配有电动多叶光栅(multileaf collimator, MLC);净化工作台购自美国ChemFocus公司(NO400-400E型);电子天平购自瑞士Mettler公司(AE100型);倒置相差显微镜购自日本Nikon公司;EC-200型游标卡尺购自成都量具刃具股份有限公司。

1.3 实验动物与细胞株

健康雄性BALB/c小鼠32只,6~8周龄,体

质量18~22 g,通过河北省实验动物中心购买,实验动物合格证编号:806114。小鼠结肠腺癌colon26细胞系由河北医科大学第四医院科研中心提供。

1.4 小鼠结肠癌移植瘤模型建立

将colon26细胞体外培养至指数生长期,制备colon26单细胞悬液进行动物接种,取0.2 mL细胞悬液(约含瘤细胞 1×10^6),注射于小鼠前腿皮下,共接种32只,成瘤率100%,建立小鼠移植瘤模型,进行抑瘤作用的检测。

1.5 动物的分组及处理方法

①实验分组、给药和照射方法:接种后1周将32只小鼠随机分至对照组、单纯放疗组(R组)、沙利度胺组(T组)和沙利度胺联合放疗组(T+R组),每组8只;对照组用0.9%NaCl溶液0.3 mL灌胃,每天1次,沙利度胺组按每天200 mg/kg计算,用0.9%NaCl溶液溶解灌胃;照射时小鼠在非麻醉状态下捆绑固定,用6MVX线 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 射野,SSD=100 cm,照射剂量为8 Gy,剂量输出率300 MU/min。②肿瘤生长曲线:治疗后隔日测量肿瘤长径(a)和与其垂直短径(b),肿瘤体积大小的估算公式采用 $ab^2/2$,以肿瘤生长时间为横坐标,肿瘤平均体积为纵坐标,绘制肿瘤生长曲线;依据肿瘤体积按如下公式计算肿瘤生长抑制率,肿瘤生长抑制率=(1-实验组平均瘤体积/对照组平均瘤体积) $\times 100\%$ 。饲养至第22天脱颈椎处死小鼠,剥离肿瘤置于4%中性甲醛中固定。③肿瘤生长延迟(tumor growth delay, TGD)时间及放射增敏比(sensitization enhancement ratio, SER):各实验组肿瘤体积增长至实验开始时体积的5倍所需时间与对照组肿瘤所需时间的差为该组TGD时间;T+R组TGD时间与R组的TGD比为该药物方式对

照射的SER^[3]。

1.6 肿瘤细胞坏死程度判断

每张切片先在低倍镜($\times 100$)下观察整体染色情况, 后用高倍镜($\times 200$)观察切片的10个视野, 每个视野计数100个瘤细胞中的坏死细胞数, 取其均数代表肿瘤组织中的坏死水平。

1.7 免疫组化技术检测微血管密度(microvessel density, MVD)

CD34染色标记血管内皮细胞, 以见到染黄色至棕色为阳性标准; 任何被抗体染色的单个内皮细胞或细胞团, 不管是否形成官腔, 只要与周围微血管、肿瘤细胞和其他连接组织有清楚界限, 都认为是一个可计数的微血管, 计数过程参照Weidner评价方法^[4]: 先在低倍镜下($\times 40$)扫描整个切片, 寻找“热点”一血管密度区, 再在高倍镜下($\times 200$)下计数染成棕黄色的血管数目, 结果用5个200倍视野下血管数目的平均数表示。

1.8 统计学处理

用SPSS 16.0统计学软件进行数据处理, 各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示。两个独立样本组间均数比较用*t*检验, 多组间均数差异性比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各实验组对colon26结肠癌小鼠移植瘤生长的影响

治疗前各组colon26结肠癌移植瘤体积差异无统计学意义。随着治疗时间的推移, 肿瘤体积逐渐增大, 对照组移植瘤平均体积明显大于各实验组($P < 0.05$, 图1), 其中T+R组移植瘤生长最缓慢, 肿瘤生长曲线最平缓。与对照组比较, T+R组、R组移植瘤体积增长到实验开始5倍的TCD分别为5.9和2.6 d, SER为2.27, 即T+R组的放射增敏比是R组的2.27倍。

治疗第22天, 各实验组与对照组移植瘤体积均数相比, 差异有统计学意义($F = 33.35$,

$P < 0.05$, 表1); 与对照组比较, T组、R组和T+R组的抑瘤率分别为41.7%、46.5%和61.9%。

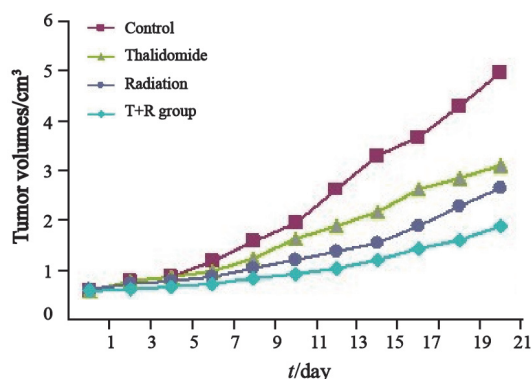


图1 各组移植瘤生长曲线图

Fig. 1 The growth curve of xenograft in each group

表1 各组肿瘤体积和肿瘤生长抑制率

Tab. 1 Tumor volumes and inhibitory rate of tumor growth in different groups

Group	Tumor volumes/cm ³	Inhibitory rate of tumor growth/%
Control	4.97±1.20	-
Thalidomide	2.90±0.92	41.7
Radiation	2.66±0.88	46.5
T+R	1.89±0.76	61.9

2.2 光镜下肿瘤组织的病理形态

治疗结束后处死小鼠, 常规病理苏木精-伊红(HE)染色, 对照组肿瘤细胞生长旺盛(图2A), 成片状分布, 少见肿瘤坏死区; T组肿瘤细胞体积较小, 核致密, 染色质浓缩边集(图2B), 个别瘤细胞核断裂形成大小不等的细胞核小体; R组可见较多的肿瘤坏死区和极少量的组织浓染区, 组织内存在一些异常的肿瘤细胞, 这些细胞在正常的肿瘤细胞之间呈小的巢状分布, 细胞核浓染、坏死、固缩(图2C)。T+R组可见大片肿瘤坏死区域, 几乎见不到正常的肿瘤细胞, 只有在肿块的外周区域可见少量的肿瘤细胞(图2D)。

2.3 对MVD表达的影响

CD34标记的小鼠移植瘤血管内皮细胞为棕黄色。对照组MVD数量最多, 分布最密集; T+R组MVD数量最低, 坏死区所占比例大, 移植瘤组织内MVD表达明显少于其他各组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3, 表2)。

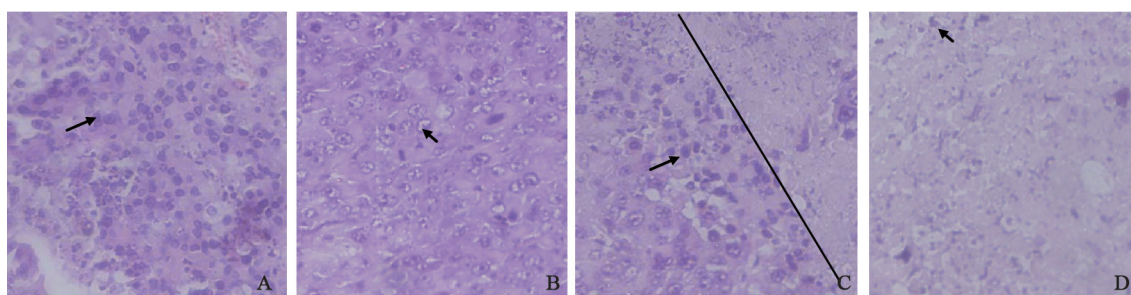


图2 显微镜观察各组组织学形态

Fig. 2 Morphological features of tumor tissue by microscope

A: Control group; B: Thalidomide group; C: Radiation group; D: Thalidomide+radiation group.

(×200)

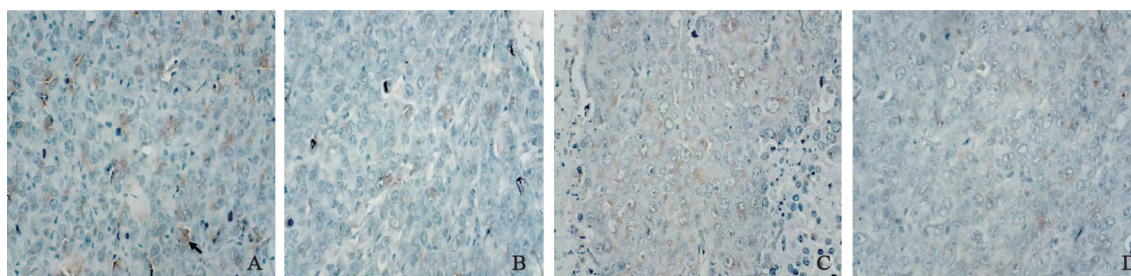


图3 各组移植瘤中MVD的表达

Fig. 3 The expression of MVD in each group

A: Control group; B: Thalidomide group; C: Radiation group; D: Thalidomide+ radiation group.

(×200)

表2 各组中MVD和坏死细胞计数

Tab. 2 The MVD and necrosis cells in different groups

Group	MVD	Necrosis cells
Control	36.57±10.24	46.78±9.44
Radiation	22.76±10.98	59.66±6.77
Thalidomide	21.67±9.30	60.92±5.11
T+R	19.47±10.60	63.45±6.24

($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

沙利度胺又名反应停，为谷氨酸衍生物，属于非巴比妥类镇静催眠药。近年来的基础与临床研究发现，沙利度胺可以通过抑制肿瘤血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)分泌，实现抗血管生成的特性；调节T淋巴细胞功能和增强自然杀伤细胞的活性，改善机体免疫功能，发挥其抗肿瘤的活性^[5-6]。抗肿瘤血管生成是一种新的针对肿瘤新生血管网络的治疗方法，近年来通过与放射治疗联合，取得了较好的疗效^[7-8]。目前，应用于临床特异性的抗血管生成药物有

贝伐单抗、恩度等，但因其价格昂贵，难以广泛应用于临床。而沙利度胺作为一种廉价的抗血管生成药物，是人们用得起的抗血管生成药物，本研究从肿瘤血管形成的角度初步探讨其放疗增敏机制。

MVD被公认为最理想的反映肿瘤血管生成情况的指标，其利用针对血管内皮细胞抗原的免疫组化技术对肿瘤血管进行定量，可直接量化反映肿瘤血管生成的程度。MVD的高低不仅与肿瘤恶性程度、侵袭性、肿瘤的复发和转移及肿瘤患者的预后密切相关^[9]，而且与放射敏感性关系最为密切，高MVD比低MVD者放射敏感性好^[10]。因此本研究选择了MVD为主要研究目标，作为判断结肠癌放射敏感性的指标。

本研究结果显示, 沙利度胺联合放疗能明显抑制结肠癌移植瘤生长, 对肿瘤的抑制作用明显优于单纯沙利度胺或单纯放疗治疗, 在抑瘤率稍低于周菊英等^[11]的报道。其原因可能与实验选择的药物及细胞本身对放射敏感性程度有关, 但仍能提示放射联合沙利度胺可获得更好的肿瘤控制率。实验中我们还观察到T+R组抑制移植瘤生长的作用明显强于R组或T组, 而不是两单纯组作用效果的简单相加, 其原因为肿瘤形成过程是一个复杂的过程, 有多种因素及机制参与, 需进一步探讨和研究。

本研究结果显示, T+R组MVD明显低于对照组、R组和T组。提示沙利度胺联合放疗可有效抑制colon26结肠癌小鼠移植瘤的血管生成。这种现象可能除了放射线直接杀死部分肿瘤细胞, 减少肿瘤组织MVD表达以外, 还可能与Ansiaux等^[12]提出沙利度胺具有改善肿瘤紊乱的血管网, 使之结构、功能趋于正常化, 从而改善肿瘤组织的微循环, 提高肿瘤组织氧分压和血流灌注, 降低肿瘤间质压, 提高了放疗疗效有关。

本研究采用单次8 Gy放疗剂量, 主要考虑更低剂量不一定能对移植瘤产生明确的抑制效果, 而更高的剂量必然延长实验照射次数, 增加实验难度; 同时, 更高的照射剂量可能掩盖沙利度胺的疗效, 反而不利于实验观察。

本研究证实了沙利度胺联合放疗能够显著提高colon26结肠癌小鼠移植瘤的放射敏感性, 其机制可能与降低肿瘤组织中MVD的阳性表达有关, 这为临床综合治疗提供了一条新思路。

[参 考 文 献]

[1] ESTEVES F P, SCHUSTER D M, HALKAR R K.

Gastrointestinal tract malignancies and positron emission tomography: an review [J]. *Semin Nucl Med*, 2006, 36(2): 169-181.

[2] YU J, LIU F, SUN Z, et al. The enhancement of radiosensitivity in human esophageal carcinoma cells by thalidomide and its potential mechanism [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26(2): 219-227.

[3] 孙明霞, 李洪振, 高献书, 等. 顺铂和洛铂与放射联合对小鼠肺癌移植瘤生长的影响 [J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2011, 20(4): 351-354.

[4] WEIDNER N, SEMPLE J P, WELCH W R, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 199, 324(1): 1-8.

[5] DAVIS M, LASHEEN W, WALSH D, et al. A phase II dose titration study of thalidomide for cancer-associated [J]. *J Pain Symptom Manage*, 2012, 43(1): 78-86.

[6] UACH H, RITCHIE D, STEWART A K, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 22-32.

[7] 孙志强, 于静萍, 张志明, 等. 重组人血管内皮抑素对食管癌细胞的放射增敏作用及其机制 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2013, 33(4): 346-350.

[8] 杨东红, 余忠华, 王镇南, 等. 西妥西单抗联合放疗对鼻咽癌细胞凋亡影响的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(14): 1053-1056.

[9] CHEN J, SHAO S, NAKADAL K. Dominant-negative hypoxia inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(4): 1283-1291.

[10] YIM S F, LOK I H, CHEUNG L P, et al. Dose-finding study for the use of long-acting gonadotrophin-releasing hormone analogues prior to ovarian stimulation for IVF [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(3): 492-494.

[11] 周菊英, 尹预真, 徐晓婷, 等. 重组人血管内皮抑素对鼻咽癌细胞系及裸鼠移植瘤的放射增敏研究 [J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2011, 20(2): 121-122.

[12] ANSIAUX R, BAUDELET C, JORDAN B F, et al. Thalidomide radiosensitizes tumors through early changes in the tumor microenvironment [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(2Pt1): 743-750.

(收稿日期: 2013-12-07 修回日期: 2014-01-24)