

放射性粒子¹²⁵I 联合 DDP 对 H22 肝癌的病理变化研究

韦长元*, 杨伟萍, 覃庆洪, 李挺, 欧超

(广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021)

[摘要] 目的:探讨放射性粒子¹²⁵I联合顺铂(DDP)植入 H22 肝癌组织后,观察肝癌的病理变化。方法:分别把¹²⁵I, DDP 和两者联合植入荷 H22 肝癌小鼠瘤体内 28 d,观察肿瘤生长,应用光镜和电子显微镜观察 H22 肝癌细胞的变化情况。结果:¹²⁵I, DDP 植入肿瘤组织后,瘤体生长受到一定的影响;两者合用后致肿瘤生长变慢且出现变性坏死。镜下观察:¹²⁵I, DDP 两组可见癌细胞形态不规则,有坏死的癌细胞,周围组织有大量淋巴细胞浸润;¹²⁵I + DDP 组癌组织以癌细胞坏死为特征;电镜下¹²⁵I, DDP 两组核膜完整,染色质分布均匀,核仁浓缩或碎裂,凋亡小体形成,粗面内质网结构松散、脱粒、滑面内质网增多,其间有较多凋亡的癌细胞,并有多个凋亡细胞聚集;而¹²⁵I + DDP 组为坏死或不完全坏死的癌细胞为主,其间也有凋亡的癌细胞。结论:放射性粒子¹²⁵I 与 DDP 组织间植入可导致肿瘤变性、死亡,还可诱导肿瘤细胞凋亡,是一种简便易行,安全有效的新治疗。

[关键词] H22 肝癌细胞;¹²⁵I 粒子;顺铂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0223-04

Pathological Change of H22 Hepatoma Cells Induced by Radioactive Particle¹²⁵I Combined with Cisplatin

WEI Chang-yuan*, YANG Wei-ping, QIN Qing-hong, LI Ting, OU Chao

(Affiliated Cancer Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pathological change of H22 hepatoma induced by radioactive particle¹²⁵I combine with cisplatin (DDP). **Method:** ¹²⁵I, Cisplatin (DDP) and ¹²⁵I combined with DDP were implanted into the mice H22 hepatoma, individually. After 28 days, the tumor growth was observed, and the pathological change in the cells were investigated by optical microscope and electron microscope. **Result:** After ¹²⁵I, DDP were implanted into the mice H22 hepatoma, the tumor growth showed fast at first phase and then became slow; ¹²⁵I combined with DDP made the tumor growth slower with cell degeneration and necrosis. Under the optical microscope, cells of ¹²⁵I group and DDP group had a irregular shape, part of cells showed necrosis and surrounding tissue cells had lots of lymphocytes. But the characteristics of ¹²⁵I combined with DDP was cells necrosis. Under the electron microscope, the nuclear membrane was complete, chromatin distributed uniform, nucleolus was concentrated or fragmented and the apoptotic bodies were form. The configuration of rough endoplasmic reticulum was loosening and degranulated, with increasing endoplasmic reticulum, which had more apoptosis of cancer cells, and had more apoptotic cells aggregated in the ¹²⁵I group and DDP group. But the ¹²⁵I combined with DDP group was with necrosis or incomplete necrotic cells mainly, which also had the apoptosis cancer cells. **Conclusion:** The interstitial implant of radioactive seed¹²⁵I induces hepatoma cells apoptosis. ¹²⁵I combined with DDP induces apoptosis, cell degeneration and necrosis.

[Key words] H22 hepatoma cells; ¹²⁵I; cisplatin

[收稿日期] 2011-01-24

[基金项目] 广西科技厅基金项目(桂科基 0575064, 桂科攻 10124001A-3)

[通讯作者] * 韦长元, 教授, 从事肝癌、乳腺癌的防治研究, Tel: 0771-5332606, E-mail: weicy63@ yahoo. com. cn

近年来,国内外多篇报道¹²⁵I 放射性粒子治疗各种恶性肿瘤取得了良好的临床治疗效果^[1-4]。但其具体机制究竟是通过诱导细胞凋亡还是直接导致细胞坏死,目前国内外尚无系统研究报道。本研究利用¹²⁵I 放射性粒子对 H22 肝癌进行组织间植入并联合 DDP 药物治疗,采用光镜和电子显微镜观察 H₂₂ 肝癌细胞的病理变化,探讨¹²⁵I 粒子对 H22 肝癌细胞增殖、凋亡等的影响,以进一步了解¹²⁵I 粒子及联合化疗药物的抗肿瘤疗效和生物学作用原理。

1 材料

封闭型¹²⁵I 放射性粒子由浙江宁波君安制药有限公司提供,其活度为 2.15×10^7 Bq, 能量为 27.4 keV 和 31.4 keV X 射线及 25.5 keV 光子,半衰期为 59.6 d。顺铂(DDP)为浙江海正药业公司出品。昆明种小鼠,由广西医科大学动物实验中心提供,鼠龄 4~6 周,体质量 18~22 g,在 SPF 环境下饲养。H22 肝癌实验癌株由广西中医药研究所提供。

2 方法

2.1 H22 肝癌细胞培养 H22 肝癌细胞采用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基,含 10^5 u·L⁻¹ 链霉素和青霉素,置于 37 ℃,含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,1.25 g·L⁻¹ 胰蛋白酶和 0.2 g·L⁻¹ EDTA 消化传代。

2.2 荷瘤小鼠的建立和分组 取 H22 肝癌癌株,调整细胞密度为 2×10^5 个/mL,将 0.2 mL 细胞悬液注射于昆明小鼠右侧肩背部皮下,SPF 环境下饲养 10 d 后成瘤,肿瘤直径约 1 cm,利用随机排列表完全随机设计分为 4 组。每组 10 只,分别为:组织间植入¹²⁵I 粒子组,组织间植入化疗药 DDP 组,¹²⁵I 粒子 + DDP 组,模型组。¹²⁵I 粒子的植入量根据组织间植入 TPS(treatmentplanningsystem,治疗计划系统)计算,¹²⁵I 粒子组和¹²⁵I 粒子联合 DDP 组每个小鼠瘤体内植入 1 粒活度为 2.15×10^7 Bq 的¹²⁵I 粒子,DDP 剂量 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤大小,观察小鼠及肿瘤生长情况。观察至 28 d 后处死小鼠,解剖剥离瘤体组织,称量体质量、瘤质量。取 1/4 肿瘤组织用 10% 中性甲醛固定,另 1/4 组织置于预冷的 3% 戊二醛液固定。

2.3 检测方法 取用甲醛保存肿瘤组织按常规制备石蜡切片,HE 染色,显微镜下观察¹²⁵I 放射性粒子对 H22 肝癌组织的损伤程度和范围;把置于戊二醛液保存的肿瘤组织按电镜检查要求制成超薄切片,

在 JEM-1200EX 型透射电子显微镜下观察、照相。

2.4 统计学处理 所有数据均用 SPSS 13.0 处理,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均值比较采用单因素方差分析 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 荷瘤小鼠肿瘤形态学改变 4 组小鼠按实验设计观察,对照组肿瘤增大速度较其他 3 组更快,20 d 时,有 3 只肿瘤直径最大达 3.5 cm,后因增大的肿瘤出现部分液化坏死,破溃而变小。¹²⁵I, DDP 两组早期肿瘤生长稍快,在治疗后至 15 d 左右肿瘤生长变慢。¹²⁵I + DDP 组肿瘤在治疗 8~10 d 后生长变慢,有 4 例肿瘤可见明显坏死,皮肤出现破溃。观察期间 DDP 组有 1 只小鼠死亡,¹²⁵I + DDP 组有 2 只小鼠死亡。实验结束后,各组的数量、体质量、肿瘤质量如表 1 所示,4 组小鼠质量间比较,无显著性差异;¹²⁵I + DDP 组小鼠的肿瘤体积和质量均明显小于¹²⁵I 组与 DDP 组,其组间差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 放射性粒子¹²⁵I、DDP 等对小鼠 H22 肝癌的作用

组别	n	小鼠质量/g	肿瘤体积/cm ³	肿瘤质量/g
¹²⁵ I	10	25.39 ± 3.18	2.03 ± 0.21 ¹⁾	3.28 ± 0.46 ¹⁾
DDP	9	26.07 ± 2.53	2.36 ± 0.25 ¹⁾	3.79 ± 0.63 ^{1,2)}
¹²⁵ I + DDP	8	25.68 ± 4.22	1.59 ± 0.09 ^{1,2,3)}	2.71 ± 0.12 ^{1,2,3)}
模型组	10	22.88 ± 4.22	3.04 ± 0.29	4.81 ± 0.12

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与¹²⁵I 组比较²⁾ $P < 0.01$;与 DDP 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 各组小鼠肿瘤组织形态学变化 普通光镜下观察,¹²⁵I 组、DDP 组可见肿瘤细胞形态不规则,伴有部分肿瘤细胞坏死,其周围组织大量淋巴细胞浸润;而¹²⁵I + DDP 组组织以肿瘤细胞坏死为其主要特征;模型组可见肿瘤细胞密集形成癌巢,癌细胞边界清楚。其中¹²⁵I,¹²⁵I + DDP 两组¹²⁵I 粒子周边细胞伴有损伤,损伤程度由粒子籽源周边向外逐层减弱,距粒子籽源 1~2 mm 处见大片细胞坏死区,细胞结构明显破坏;3~5 mm 处可见有变性坏死的细胞,以细胞结构模糊、核固缩、核深染、核仁边界不清为主要表现,同时¹²⁵I 组组织中慢性炎细胞浸润和组织反应较其他组明显;在距粒子籽源 5 mm 以上未见组织损伤征象。见图 1~2。

3.3 各组肝癌组织超微结构变化 电镜下¹²⁵I, DDP 两组细胞的核膜完整,细胞内染色质分布均匀,可见有较多凋亡的癌细胞;而模型组为坏死的癌细胞为主,其间也有凋亡的癌细胞,细胞核呈不规则,

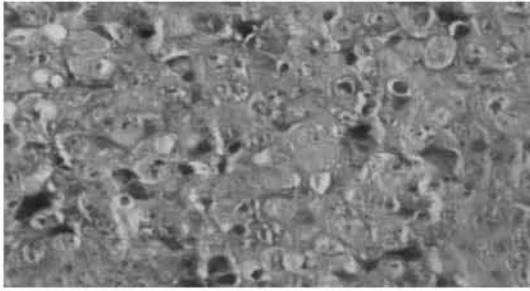


图1 ¹²⁵I + DDP 组治疗后 H22 肝癌组织病理改变(HE,10 × 2.5) 部分核呈缢断像、核边集、核不均一、固缩核形态大小不等、核浆比值增大、胞质少、细胞变圆、核内染色



图2 ¹²⁵I 组治疗后有淋巴细胞浸润(HE,10 × 2.5) 质浓集成块,部分肝癌细胞崩解,可见无核质圆形小体,溶酶体增多增大。见图3。

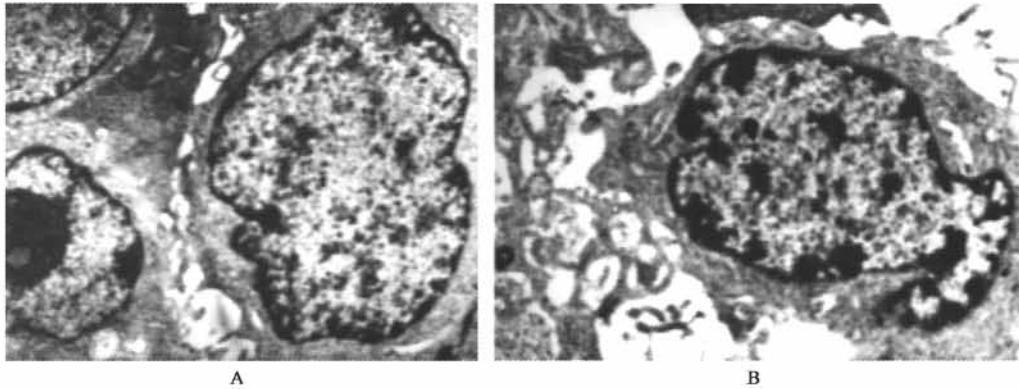


图3 ¹²⁵I 粒子植入 H22 肝癌后组织超微结构的改变(×4 800)

4 讨论

将抗肿瘤药物直接注入到肿瘤部位,避免了药物在体内转运中的生理屏障,减少了药物的代谢清除,减少了身体其他部位的药物分布,可在肿瘤部位达到极高的药物浓度,显著增加了其生物利用度;而在其他部位的药物浓度大大降低,有利于肿瘤的治疗,并减少了全身化疗的毒副作用^[5],也利于实验小鼠的存活。通过动物实验,应用¹²⁵I粒子和常用的化疗药 DDP 后,直接观察肿瘤生长情况及测量肿瘤大小的形态学变化,各组小鼠的 H22 肝癌瘤体的生长速度与对照组比较均受到了一定的影响,特别是¹²⁵I 粒子与 DDP 联合应用后,肿瘤生长速度明显较明显¹²⁵I, DDP 和对照组慢,同时肿瘤的体积和质量明显小于其他 3 组,大体标本也见到¹²⁵I + DDP 组瘤体组织发生变性、坏死。提示¹²⁵I 粒子与 DDP 联合组织间治疗肿瘤有明显的协同效果。通过光学显微镜观察模型组的肿瘤细胞生长活跃,肿瘤细胞密集成癌巢,周边大量淋巴细胞浸润,肿瘤外周有小血管增生,个别样本瘤体过大,内部血供不足,导致肿瘤中心出现大片红染的凝固性坏死区;DDP 组肿瘤细胞形态不规则,伴有部分肿瘤细胞坏死,¹²⁵I 组和¹²⁵I +

DDP 组除大体可见的坏死肿瘤外,镜下所见的细胞变性、坏死以及损伤程度是以¹²⁵I 放射性粒子为中心向外表逐渐减弱,距¹²⁵I 粒子籽源 1 ~ 2 mm 处见大片细胞坏死区,细胞结构明显破坏;3 ~ 5 mm 处可见有变性坏死的细胞,以细胞结构模糊、核固缩、核深染、核仁边界不清为主要表现(图 1),同时在单纯植入¹²⁵I 粒子的组织中慢性炎细胞浸润和组织反应较其他组明显(图 2);在距粒子籽源 5 mm 以上未见组织损伤征象,个别样本出现离粒子较远的肿瘤组织有继续生长的现象。提示了在临床上要严格按照 TPS 计划,合理分布粒子,提高肿瘤组织的照射剂量率,减少剂量“冷点”的区域,这样¹²⁵I 粒子才能发挥更好的治疗效果。

研究表明,¹²⁵I 粒子植入可诱导肝癌细胞凋亡^[6-8]。其细胞凋亡以早期细胞为主,这可能与放射性粒子¹²⁵I 低剂量率 γ 射线持续照射,引起肿瘤细胞核小体连接 DNA 部位被切断,诱发细胞发生凋亡^[9-10]。韦长元等^[11]通过电镜观察应用 DDP 后肝癌细胞超微结构的改变,证明了 DDP 能诱导肝癌细胞发生凋亡作用。本实验电镜观察¹²⁵I 粒子联合 DDP 后 H22 肝癌细胞超微结构的改变,可见细胞内

质网肿胀、线粒体肿大呈空泡样,溶酶体增多,胞膜皱缩,核固缩,核质沿核膜浓缩边集,形成团块或新月形小体,有的细胞核碎裂,形成凋亡小体等细胞凋亡形态学上的变化(图 3)。以上结果提示¹²⁵I 粒子联合 DDP 治疗,增强了 DDP 对 H22 的促凋亡作用,使肿瘤细胞大规模的凋亡,而且还使较多的细胞发生变性、坏死,优于单纯¹²⁵I 粒子组或 DDP 组的治疗效果。笔者认为这可能是在¹²⁵I 粒子低剂量率 γ 射线持续照射后,导致肿瘤细胞核小体连接 DNA 部位被切断。同时在肿瘤细胞受照射后致其结构或功能被改变,DDP 有可能进一步发挥其细胞毒作用,直接致肿瘤细胞死亡。

本研究结果提示,应用¹²⁵I 放射性粒子与 DDP 联合治疗肿瘤,可减少化疗药物剂量,有效降低细胞毒性反应,同时减轻外放射引起的皮肤急性反应和组织纤维化等并发症,起到安全、协同、增效的作用。组织间¹²⁵I 粒子近距离放疗联合化疗是一种简便易行,安全有效的新治疗方法,值得进一步研究和推广应用。

[参考文献]

[1] 张维浩,王绍奎,王增强,等.经肝动脉化疗栓塞联合放射性¹²⁵I 粒子植入治疗中晚期原发性肝癌 45 例疗效观察[J].中华肿瘤防治杂志,2006,13(12):956.
[2] Sto G, Cahlon O, Cesaretti J A, et al. Combined modality treatment in the management of high-risk prostate cancer [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 59(5):1352.

[3] 罗开元,毛文源,李波,等.¹²⁵I 粒子组织间永久植入治疗恶性肿瘤的疗效观察[J].中华外科杂志,2003, 41(2):122.
[4] 王俊杰,唐劲天,黎功.放射性粒子近距离治疗肿瘤[M].北京:北京医科大学出版社,2001:112.
[5] Lesniak M S, Upadhyay U, Goodwin R, et al. Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats[J]. Anticancer Res, 2005, 25(6B): 3825.
[6] 赵泉,罗开元,时德.¹²⁵I 粒子肝肿瘤组织间植入治疗诱导凋亡的研究[J].中华实验外科杂志,2005, 22(1):112.
[7] 徐静,梅铭惠,陈谦,等.术中组织间植入¹²⁵I 粒子治疗肝恶性肿瘤[J].中华实验外科杂志,2005, 22(3):368.
[8] 宋金龙,邵文博,唐宪民.¹²⁵I 粒子距离照射治疗原发性肝癌的实验研究[J].肿瘤防治杂志,2003, 12(10):750.
[9] 韦长元,杨伟萍,李挺,等.放射性粒子¹²⁵I 对 H22 肝癌细胞凋亡的研究[J].中华肿瘤防治杂志,2007, 14(14):1070.
[10] 苏成海,法逸华,许玉杰,等.低剂量率 γ 射线杀伤肿瘤细胞机制的实验研究[J].核技术,2006, 29(5):362.
[11] 韦长元,陈建思,刘剑仑,等.应用顺铂后肝癌细胞超微结构的研究[J].中华肝病杂志,2000, 8(2):89.

[责任编辑 何伟]

欢迎订阅 2011 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、药理、临床、综述、学术交流、基层园地、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16 开本,290 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。2011 年每期定价 25 元,全年 24 期定价为 600 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjzz.com