

文章编号:1005-6947(2007)07-0642-04

· 基础研究 ·

# <sup>103</sup>钯胆管放射性支架释放的 $\gamma$ 射线诱导胆管癌细胞凋亡的研究

何贵金<sup>1</sup>, 隋东明<sup>2</sup>, 于发强<sup>1</sup>, 纪大伟<sup>1</sup>, 高沁怡<sup>3</sup>, 戴显伟<sup>1</sup>, 高红<sup>1</sup>, 蒋涛<sup>1</sup>, 戴朝六<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学第二临床学院 肝胆、乳腺外科, 辽宁沈阳 110004; 2. 辽宁省盘锦市中医院 外科, 辽宁盘锦 140023; 3. 中国医科大学第一临床学院 核医学科, 辽宁沈阳 110001)

**摘要:**目的 探讨<sup>103</sup>钯(<sup>103</sup>pd)释放的 $\gamma$ 射线治疗胆管癌的作用机制。方法 用MTT法分析<sup>103</sup>pd释放的 $\gamma$ 射线对胆管癌细胞生长的影响,用电镜、DNA凝胶电泳和流式细胞仪观察细胞形态和凋亡率的变化。结果 <sup>103</sup>pd释放的 $\gamma$ 射线明显抑制胆管癌细胞生长。5.333 mci剂量的 $\gamma$ 射线诱导出典型的细胞凋亡特征,如凋亡小体、特征性亚G<sub>1</sub>峰等。6.645 mci以上剂量的 $\gamma$ 射线导致细胞坏死。结论  $\gamma$ 射线诱导胆管癌细胞凋亡可能是放射治疗胆管癌的重要机制之一,<sup>103</sup>pd释放的 $\gamma$ 射线诱导胆管癌细胞凋亡与照射剂量有密切关系。

[中国普通外科杂志,2007,16(7):642-645]

**关键词:** 胆管肿瘤/辐射效应;  $\gamma$ 射线; 细胞凋亡

中图分类号:R 735.8

文献标识码:A

## Study on induction of apoptosis of biliary duct cancer cells by $\gamma$ -ray of the <sup>103</sup>pd biliary stent

HE Gui-jin<sup>1</sup>, SUI Dong-ming<sup>2</sup>, YU Fa-qiang<sup>1</sup>, JI Da-wei<sup>1</sup>, GAO Qin-yi<sup>3</sup>, DAI Xian-wei<sup>1</sup>, GAO Hong<sup>1</sup>, JIANG Tao<sup>1</sup>, DAI Chao-liu<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, the Second Clinical College, China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Department of Surgery, Traditional Chinese Medical Hospital of Panjin City, Liaoning 140023, China; 3. Department of Nuclear Medicine, the First Clinical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism and role of  $\gamma$ -ray of <sup>103</sup>pd in the treatment of biliary duct cancer. **Methods** A series of biliary duct cancer cells were treated with different  $\gamma$ -ray dose, and MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium-bromide] technique was used to determine the inhibition rate of  $\gamma$ -ray of <sup>103</sup>pd on the biliary duct cancer cells; and electron micro-technique, DNA agarose gel electrophoresis and flow cytometry to evaluate the morphological characteristics and apoptosis rate of the biliary duct cancer cells were also used. **Results** The  $\gamma$ -ray radiation of <sup>103</sup>pd resulted in significant inhibition of the biliary duct cancer cells. The features of biliary duct cancer cells apoptosis (e.g.: apoptic bodies, DNA ladders band hypodiploid DNA peak) could be seen in the group with lower dosage (5.333mci), and cell necrosis was seen in higher dosage (more than 6.645 mci). **Conclusions** The  $\gamma$ -ray radiation could induce apoptosis of the biliary duct cancer cells, but with dose dependence, and apoptosis can be an important mechanism for radiation treatment of biliary duct cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(7): 642-645]

**Key words:** Bile Duct Neoplasms/rad eff;  $\gamma$ -ray radiation; Apoptosis

**CLC number:** R 735.8

**Document code:** A

**基金项目:**辽宁省自然科学基金资助项目(20042063);辽宁省教育厅资助项目(05L445)

**收稿日期:**2007-01-05; **修订日期:**2007-07-12。

**作者简介:**何贵金,男,辽宁沈阳人,中国医科大学附属二院副教授,主要从事辐射诱导胆管癌细胞凋亡机制方面的研究。

**通讯作者:**何贵金 E-mail:23318199@163.com

肝外胆管癌手术切除率低(10%~20%)<sup>[1]</sup>,主要死亡原因为局部侵犯和所致梗阻性黄疸及反复发作的急性胆管炎。虽然高剂量体外放射治疗(55Gy)可延长患者的生存期<sup>[2-3]</sup>,但由于周围肝、肾和胃肠道等敏感器官的限制,很难达到预期的剂量。近年来迅速发展的肿瘤介入治疗——经皮肝穿刺胆道金属内支架的植入<sup>[4]</sup>,为胆管内高剂量近距离治疗提供了新的途径,笔者研制的<sup>103</sup>钷(<sup>103</sup>Pd)胆管放射性支架是在肿瘤的局部集中高剂量照射,对周围正常组织的影响较小,为此,笔者将<sup>103</sup>Pd胆管放射性支架释放的 $\gamma$ 射线对胆管癌细胞的作用及其可能的机制作一实验研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 <sup>103</sup>Pd胆管放射性支架

<sup>103</sup>Pd支架是指用镍钛记忆合金支架将<sup>103</sup>Pd由加速器将质子打入<sup>103</sup>Rh并释放1个中子生成 $[^{103}\text{Rh}(p, h)^{103}\text{Pd}]$ 的装置,但需经化学方法提纯<sup>103</sup>Pd含量。<sup>103</sup>Pd的能量在21~23keV,释放低能量 $\gamma$ 射线,半衰期为17d,衰变后转为稳定态的<sup>103</sup>Rh。<sup>103</sup>Pd支架由中国原子能研究院同位素研究所提供,采用化学电镀方法将上述<sup>103</sup>Pd电镀于支架上,通过电镀液含<sup>103</sup>Pd的浓度及电镀时间控制支架表面<sup>103</sup>Pd的量以达到金属支架释放低能量 $\gamma$ 射线所需浓度。

### 1.2 胆管癌细胞的培养

由解放军第三军医大学西南医院肝胆外科中心提供的人胆管癌细胞株,用0.25%胰蛋白酶消化传代,继续培养,取第5至第15代指数生长期细胞进行实验。

### 1.3 $\gamma$ 射线对胆管癌细胞生长的影响

将培养瓶中细胞消化后形成的胆管癌低分化腺癌细胞悬液,按 $10^5/\text{mL}$ 细胞数分装到2个塑料冻存管中,分别设置为对照组及照射实验组。

照射条件:对照组培养瓶中放入无放射性支架。实验组瓶中均放入经消毒灭菌的含不同放射剂量的<sup>103</sup>Pd支架(1.0, 5.333, 6.645, 7.985, 9.326 mci和10.637 mci)。纵向剪开<sup>103</sup>Pd支架,铺于25 mL培养瓶底;每组瓶中加入 $5 \times 10^6$ 个胆管癌细胞及10 mL培养液,置于5% CO<sub>2</sub> 37℃培养箱中。<sup>103</sup>Pd支架照射时间为12, 24, 48 h和72 h然后取出,继续培养1~5 d,然后将细胞种回96孔培养板中,加入含10%胎牛血清的培养液,在培养箱中培养,每隔2 d换液1次。

### 1.4 细胞生长曲线和生长抑制率的测定

采用改良MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2- $\gamma$ 1)-2,5-二甲基-四唑溴盐]测定法<sup>[4]</sup>测定细胞生长抑制率。取对数生长期细胞, $\gamma$ 射线处理后,按 $5 \times 10^3$ 细胞/孔接种于96孔培养板内;每孔加入含10%胎牛血清的培养液200  $\mu\text{L}$ ,分别按对照组和处理组细胞各种4个板,每组各以5个孔作为复本,分别在培养后12, 24, 48 h和72 h,用全自动酶标仪测定各孔的吸光度A值。测定波长570 nm,参考波长630 nm,酶标仪所示值为A570减去A630值。取各组的平均A值描绘细胞生长曲线。根据下列公式计算细胞生长抑制率:抑制率(%) = 对照组A值 - 处理组A值 / 对照组A值  $\times 100\%$

### 1.5 细胞超微结构观察

收集细胞悬液于事先制备好的琼脂管中,2 000 r/min离心使细胞成团,弃上清液,加入2%戊二醛固定,4℃保存30 min后,将琼脂管内细胞团块剥出,用1%锇二醛固定1~2 h。按电镜常规法制备超薄切片,透射电镜下观察超微结构的变化。

### 1.6 DNA琼脂糖凝胶电泳

收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,离心5 min(3 000 r/min);在细胞沉淀中加入500  $\mu\text{L}$  DNA提取液悬浮,55℃水浴消化过夜;酚、氯仿、异戊醇抽提后,2倍体积无乙醇沉淀DNA, TE:Rnase(1 mL:1  $\mu\text{L}$ ) 37℃水浴溶解DNA 4 h,将样品与上样缓冲液混合(1:2),以1.2%的琼脂糖凝胶电泳进行分离,溴化乙染色后,紫外灯下观察DNA电泳图谱。

### 1.7 流式细胞仪分析

将对照组和<sup>103</sup>Pd处理组癌细胞悬液分别接种于50 mL培养瓶中,孵育12~72 h;分别用酶消化贴壁细胞后,收集对照组和1.0, 5.333, 6.645, 7.985, 9.326 mci和10.637 mci <sup>103</sup>Pd照射组,12~72 h后细胞制成单细胞悬液(106细胞/mL), PBS液清洗,800~1 000 r/min离心5 min,共2次;用70%乙醇固定细胞,4℃保存,染色前用PBS进行分离沉淀去除固定液,加入500  $\mu\text{L}$ 碘化丙啶(PI)染色液(含PI 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Rnase 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 37℃避光孵浴30 min。上机测试,激发波长为488 nm。

## 2 结果

### 2.1 细胞生长曲线

胆管癌细胞经不同剂量<sup>103</sup>Pd的 $\gamma$ 射线照射后,细胞的生长趋势随照射剂量的增加而呈逐渐

抑制的趋势。1.0 mci 照射的癌细胞生长趋势与对照组基本一致,但经照射的细胞生长缓慢;5.333 mci 以上照射的细胞生长明显低于对照组,前者且呈剂量依赖性。

## 2.2 胆管癌细胞生长抑制率

经不同剂量  $\gamma$  射线照射后胆管癌细胞生长抑制率随照射剂量的升高而增加 ( $P < 0.01$ ),照射 48 h 的抑制率明显高于 24 h ( $P < 0.01$ ) (图 1)。

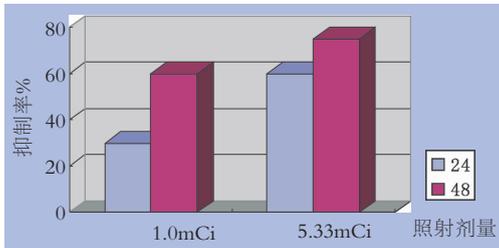


图 1 不同剂量  $\gamma$  射线照射前后胆管癌细胞的生长抑制率

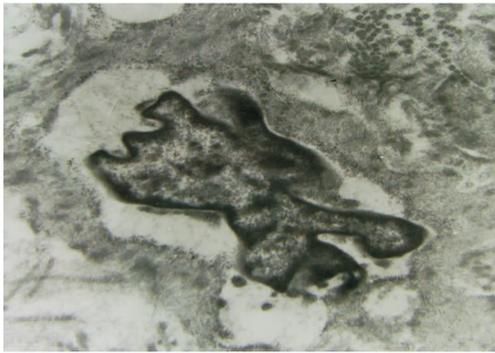


图 2 胆管癌细胞核缩小,染色质凝集,细胞表面形成许多球形突起

## 2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳

胆管癌细胞经 5.33 mci  $\gamma$  射线,照射后 48 h 处理组的 DNA 电泳呈现典型的有一定间隔的细胞凋亡梯状条带;6.64 mci 以上处理组 DNA 则呈现无间隔的涂片状带。对照组仅在近电泳点样处出现基因组条带(图 4)。

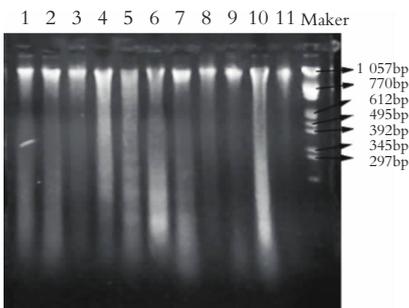


图 4 胆管癌细胞 DNA 电泳结果 5, 6, 7: 5.33 mci 处理组梯状条带; 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11: 6.645 mci 处理组涂片状带; M: markers 带

## 2.3 $\gamma$ 射线对胆管癌细胞的超微结构的影响

透射电镜下对照组细胞核大,核质均匀细致,胞浆内有丰富粗面内质网和线粒体。5.333 mci 处理组可见细胞凋亡的特征性形态学变化:细胞核缩小,染色质凝集,细胞表面形成许多球形突起(起泡)(图 2),突起内见被包裹的胞质与细胞器、核的碎片或整个浓缩的细胞核,部分突起与细胞脱离,形成凋亡小体 (apoptotic bodies),凋亡小体自细胞一端开始出现,小体内细胞器结构仍完整,细胞崩解成多个有膜包绕的圆形凋亡小体,有的细胞凋亡小体被邻近的细胞吞噬(图 3)。6.645 mci 以上处理组细胞肿胀,早期细胞膜、核膜仍保持其完整形态,胞浆内出现较多空泡,内质网数量较少,线粒体肿胀、裂解或空泡化,晚期细胞质膜破坏,核溶解,细胞内容物释出。

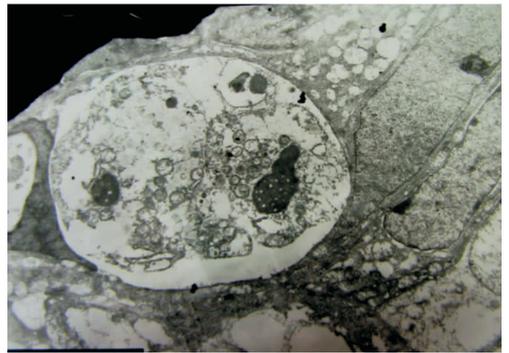


图 3 胆管癌细胞凋亡小体被邻近的细胞吞噬

## 2.5 流式细胞仪分析细胞凋亡情况

5.33 mci 剂量组的胆管癌细胞,于照射前、照射后 12 h 其凋亡率为 0,照射 24, 48 h 和 72 h 细胞凋亡率分别为 24.32%, 56.78% 和 91.34%,并在 DNA 直方图上出现典型的凋亡细胞峰(亚  $G_1$  峰)。

## 3 讨论

胆管放射性支架通过杀伤肿瘤及防止肿瘤复发所致管腔再狭窄。在提高肿瘤局部控制率的同时,在不需手术引流的情况下,能减少患者的手术创伤,最终提高患者的生存质量和生存率。Laird 等<sup>[5]</sup>认为,凋亡是一个需要基因表达、蛋白质合成和需要能量的主动过程。高照射剂量足以破坏基因转录或直接破坏细胞膜的完整性,使细胞不能维持膜内外离子梯度,故凋亡的途径不

能被启动。本研究结果证实,高剂量照射导致细胞死亡是一个被动过程,不具备凋亡的特征性变化。本研究结果显示在同一系细胞群体中,触发细胞凋亡的剂量(5.33 mci)远远低于造成细胞快速坏死所需的剂量(6.64 mci)。凋亡与坏死在治疗上的意义不同,坏死是细胞水肿、破裂和溶酶体酶释放而引起邻近细胞受损;凋亡则是一种“干净”的细胞清除过程,凋亡细胞通过形成凋亡小体而被邻近细胞吞噬、消化和溶解,不引起局部炎症反应<sup>[6]</sup>。

本研究结果表明,<sup>103</sup>pd的 $\gamma$ 射线能抑制体外胆管癌细胞的生长,且有一定的杀伤效应。通过透射电镜观察,5.333 mci 剂量照射后的胆管癌细胞形态出现细胞凋亡的两个变化阶段:一是细胞体积变小,胞核与胞浆浓缩,核裂解,细胞表面起泡,有凋亡小体形成;二是凋亡小体被周围细胞吞噬,消化降解。而6.645 mci 以上剂量组胆管癌细胞出现水肿、体积变大,细胞质膜破裂,核溶解,细胞内容物释出等细胞坏死的改变。从形态学上证实, $\gamma$ 射线在低剂量时能引起胆管癌细胞凋亡。DNA琼脂糖凝胶电泳出现有一定间隔的梯状条带和流式细胞仪检测到的特征性亚G<sub>1</sub>峰是目前判断细胞凋亡的重要指标<sup>[7-8]</sup>。本研究结果表明,胆管癌细胞经5.33 mci 剂量组照射后电泳呈典型梯状条带,流式细胞仪可检测到有特征性亚G<sub>1</sub>峰出现;6.645 mci 以上剂量组呈现无间隔的涂片状带;此现象进一步证实了在低剂量 $\gamma$ 射线便可诱导胆管癌细胞凋亡。

由此可推断,低剂量的 $\gamma$ 射线诱导细胞凋亡是胆管腔内放射治疗胆管癌的理想选择,因此将笔者研制的<sup>103</sup>pd胆管放射性支架植入到胆管腔内行腔内照射治疗胆管癌,是一种可行的新的治疗方法。

近年来,国内外报道,辐射诱导细胞凋亡出现的时间因组织细胞类型的不同而各有差异,且体内细胞凋亡出现快,高峰出现较早,体外培养细胞凋亡出现较晚<sup>[9-10]</sup>。但迄今尚无辐射诱导胆管癌细胞凋亡出现时间的报道。本实验结果显示,体外胆管癌细胞经 $\gamma$ 射线照射后,癌细胞凋亡出

现于24,48和72h的细胞凋亡率明显高于12h。

综上所述, $\gamma$ 射线诱导胆管癌细胞凋亡可能是治疗胆管癌的重要机制之一, $\gamma$ 射线所致的胆管癌细胞凋亡与照射剂量有密切关系。此结果可能为临床应用<sup>103</sup>pd支架胆管腔内照射治疗胆管癌提供了实验基础和理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Itamochi H, Yamasaki F, Sudo T, *et al.* Reduction of radiation-induced apoptosis by specific expression of Bcl-2 in normal cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 10(4):1038 - 1040.
- [2] Peschel RE, Colberg JW, Chen Z, *et al.* Iodine 125 versus palladium 103 pd implants for prostate cancer: clinical outcomes and complications [J]. *Cancer*, 2004, 10(3):170 - 174.
- [3] Yanagihara K, Nii M, Numoto M, *et al.* Use of localized intracoronary beta radiation in treatment of in-stent restenosis: the INHIBIT randomized controlled trial [J]. *Lancet*, 2002, 359(9321):1950.
- [4] Zhang H, Tsang TK, Jack CA. Bile glycoprotein mucin in sludgoccluding biliary stent [J]. *J Lab Clin Med*, 2003, 142(1):58 - 65.
- [5] Laird JR, Carter AJ, Kufs WM, *et al.* Inhibition of neointimal proliferation with low-dose irradiation from a  $\beta$ -particle emitting stent [J]. *Circulation*, 2003, 93(6):529 - 536.
- [6] Catelas I, Petit A, Zukor DJ, *et al.* Cytotoxic and apoptotic effects of cobalt and chromium ions on J774 macrophages - Implication of caspase-3 in the apoptotic pathway [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2001, 12(10):949 - 953.
- [7] Johnsson N. Asplit-ubiquitin-based assay detects the influence of mutations on the conformational stability of the p53 DNA binding domain in vivo [J]. *FEBS Lett*, 2002, 531(2):259 - 264.
- [8] Olive PL, Durand KR. Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro. [J]. *Int J Radiat Biol*, 2002, 71(4):695 - 707.
- [9] Vigliani MC, Chio A, Pezzulo T. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in low grade astrocytoma: in prognostic significance [J]. *Tumor*, 2002, 80(3):295 - 298.
- [10] Tosa M, Ghazizadeh M, Shimizu H, *et al.* Global gene expression analysis of keloid fibroblasts in response to electron beam irradiation reveals the involvement of interleukin-6 pathway [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(4):704 - 713.