

文章编号:1005-6947(2006)11-0826-05

· 基础研究 ·

# 氟尿嘧啶与生长抑素受体基因联合治疗鼠胰腺癌移植瘤的研究

杜志勇, 陈立模, 秦仁义

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 胆胰外科, 湖北 武汉 430030)

**摘要:** **目的** 观察生长抑素二型受体(SSTR2)基因体内转染后裸鼠胰腺癌移植瘤对5-氟尿嘧啶(5-FU)的反应,并探讨其可能机制。**方法** 将人胰腺癌细胞株panc-1种植于裸鼠背部皮下形成胰腺癌移植瘤模型。成模后动物随机分成4组(每组6只);I组为对照组;II组为腹腔注射5-FU治疗组;III组为瘤内注射pCMV-6C-SSTR2-脂质体转染SSTR2基因治疗组;IV组为基因治疗+5-FU治疗组。观察肿瘤生长速度,测量瘤体大小及重量。用免疫组织化学方法和免疫印迹技术(Westernblot)检测转染效率;用凋亡原位检测方法(Tunel)检测胰腺癌细胞的凋亡率。**结果** 体内转染后SSTR2可重新表达。5-FU和SSTR2基因联合治疗(IV)组肿瘤生长速度显著慢于单独基因治疗(III)组及单独5-FU治疗(II)组和空白对照(I)组( $P < 0.01$ );最终肿瘤大小,重量也显著小于其他3组(均 $P < 0.01$ ),而癌细胞凋亡率显著高于其他3组(均 $P < 0.01$ )。**结论** SSTR2重新表达后可增强胰腺癌细胞对化疗药物5-FU的敏感性,联合5-FU和SSTR2基因治疗可望成为治疗胰腺癌新的途径。

**关键词:** 胰腺肿瘤/药物疗法; 肿瘤移植/药物疗法; 氟尿嘧啶/治疗应用; 受体,生长抑素/治疗应用; 抗代谢药,抗肿瘤药/治疗应用

中图分类号:R735.9; R73-352

文献标识码:A

## Reexpression of somatostatin receptor type2 gene can enhance the effect of 5-FU on pancreatic carcinoma in vivo

DU Zhi-yong, CHENG Li-mo, QIN Ren-yi

(Department of Pancreatic-Biliary Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the therapeutic effect of 5-FU on pancreatic carcinoma after xenografts transfected with SSTR2 in vivo. **Methods** Human pancreatic cancer cells (panc-1) were inoculated subcutaneously to the back of nude mice. The animals were then divided into 4 groups randomly ( $n = 6$ /group) when tumor nodules grew to about 5 mm × 5 mm seven days later. Group I served as an untreated control, group II received 5-FU via intraperitoneal injection, group III received an intratumoral injection of a combination of pCMV-6C-SSTR2 and lipofectamine 2000; Group IV received 5-FU via intraperitoneal injection and intratumoral injection of SSTR2. Finally, the animals were anesthetized and the tumors were excised and weighed. The result of transfection was detected by immunohistochemistry and Western-blot. A quantification of apoptosis rate was then performed using Tunel method. **Results** The expression of SSTR2 was detected in pancreatic xenografts of group III and IV transfected by pCMV-6C-SSTR2-lipofectamine2000. Combination of SSTR2 gene therapy and 5-FU chemotherapy resulted in a significant effect. The tumor group rate of group IV was slower than that of the other three groups ( $P < 0.01$ ), the final size and weight of tumor was smaller than that of the other three groups ( $P < 0.01$ ), but the apoptosis rate of

**基金项目:**国家自然科学基金资助(30271473)。

**收稿日期:**2006-03-21; **修订日期:**2006-04-19。

**作者简介:**杜志勇,男,湖北仙桃人,华中科技大学同济医学院附属同济医院主治医师,博士研究生,主要从事胆道、胰腺肿瘤方面的研究。

**通讯作者:**秦仁义 电话:027-83663874; E-mail:ryqin@tjh.tjmu.edu.cn。

pancreatic cancer cells was higher than that of the other three groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Reexpression of SSTR2 can enhance the sensitivity of pancreatic carcinoma cells to 5-FU; combination SSTR2 gene therapy and 5-FU chemotherapy may be a new approach for therapy of pancreatic carcinoma.

**Key words:** Pancreas Neoplasms/durg ther; Tumor Transplantation/durg ther; Fluorouracil/ther use; Receptor, Somatostatin/ther use; Antineoplastic Drug/ther use

**CLC number:** R735.9; R73-352

**Document code:** A

生长抑素二型受体(SSTR2)表达可能是抑制胰腺肿瘤生长的重要通路,但遗憾的是几乎90%的胰腺癌丧失了表达SSTR2的能力<sup>[1]</sup>。作者<sup>[2]</sup>先前的研究表明,单独转染SSTR2基因能起到比较显著的治疗效果,其机制主要系通过诱导胰腺癌细胞凋亡而发挥作用。传统的化疗药物治疗肿瘤的一个重要机制是诱导肿瘤细胞凋亡。SSTR2基因表达后是否增强在体胰腺癌细胞对化疗药物(5-FU)的敏感性至今未见报道。鉴于此,笔者联合5-FU和SSTR2基因治疗裸鼠胰腺癌移植瘤,观察其对肿瘤的生长及癌细胞凋亡的影响,以期探索临床联合应用5-FU和SSTR2基因治疗胰腺癌的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人胰腺癌细胞株 panc-1(无SSTR2表达)购于中国医学科学院基础研究所;24只6周龄BALB/C-nu/nu裸鼠购于湖北省疾病预防控制中心;pCMV-6C-SSTR2质粒由芝加哥大学Bell教授惠赠;脂质体lipofectamine2000购于Invitrogen公司;提取质粒试剂盒购于Promega公司;抗SSTR2多克隆抗体购于Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG购于北京中山生物技术有限公司;Tunel试剂盒为德国Boehringer-Mannheim公司产品;5-FU注射剂是天津金耀氨基酸有限公司产品。

### 1.2 实验方法

1.2.1 质粒准备 用大肠杆菌DH-5 $\alpha$ 大量扩增pCMV-6C-SSTR2质粒,按照提取质粒试剂盒说明书提取质粒,保存备用。

1.2.2 细胞培养及移植瘤模型的建立 细胞用含10%胎牛血清、0.03%谷氨酰胺的DMEM培养基培养。取指数生长期细胞,用含0.01%EDTA的0.25%胰酶消化;收集细胞悬浮于无血清培养基中,调整密度为 $2.0 \times 10^7$ 个/mL。每只裸鼠皮下接种0.4mL即 $8 \times 10^6$ 个细胞。

1.2.3 实验分组及处理 7d后肿瘤长到5mm $\times$ 5mm时,动物随机分成4组,每组6只。I组为对照

组,腹腔给予磷酸盐缓冲液(PBS),量及日期同5-FU的给予;II组为5-FU治疗组,腹腔给予5-FU;III组为SSTR2基因治疗组,瘤内注射pCMV-6C-SSTR2-脂质体转染SSTR2基因;IV组为5-FU和SSTR2基因联合治疗组,腹腔给予5-FU,瘤内注射pCMV-6C-SSTR2-脂质体。瘤内注射pCMV-6C-SSTR2-脂质体分别于第7,14,21,28天进行,每次质粒与脂质体质量体积比为0.5g/L,每次注射前质粒与脂质体先分别与无血清培养基混合至50 $\mu$ L,室温静置15min,再将两者混合,室温静置15min后应用。5-FU的给予分别于第10,17,24,31天按50mg/kg进行(溶于1mL PBS中)。

### 1.3 检测指标及方法

1.3.1 肿瘤长、短径测定 每次注射前用游标卡尺测量肿瘤最长径(长)和最短径(宽)。第32天麻醉所有裸鼠,剥离肿瘤,用电子称称其重量。取少许肿瘤组织放入10%甲醛溶液中固定,其余迅速置入-70 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

1.3.2 免疫印迹(Westernblot)、免疫组织化学检测 SSTR2蛋白表达及转染效率每次取组织块100mg加入1mL匀浆缓冲液,快速冰上匀浆,12000r/min离心15min后取上清,Bradford法测定总蛋白浓度。取100 $\mu$ g总蛋白以10%SDS-PAGE凝胶电泳分离。电转移蛋白至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭过夜;加入一抗(1:1000),于封闭袋中4 $^{\circ}$ C孵育2h;加入二抗(1:5000),孵育1h。化学发光法显示结果,压片曝光。免疫组化采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶标法(SP)法。一抗1:100,二抗1:500。空白对照采用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。每只裸鼠移植瘤的免疫组化切片取2张,40 $\times$ 高倍镜下计数连续10个视野,至少5000个细胞,计算转染效率。

1.3.3 Tunel检测细胞凋亡率 按Boehringer-Mannheim公司产品说明书操作。

### 1.4 统计学处理

数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。显著性差异采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SSTR2 蛋白表达及转染效率的测定

2.1.1 免疫组化结果 图中呈棕色颗粒即为转染

成功的细胞(转染效率为2%)。颗粒主要在细胞浆中,大小不等,分布不均;I(对照)组,II(5-FU)组无棕色颗粒(图1)。

I 组

II 组

III 组

IV 组

图1 免疫组化结果(SP × 400)

2.1.2 Westernblot 结果 III(基因)组,IV(联合)组出现 SSTR2 特异性蛋白目的条带;I,II 组中无特异性蛋白目的条带(图2)。

以上结果说明瘤内注射质粒脂质体混合物的方式可导致胰腺癌组织中癌细胞重新表达 SSTR2 蛋白。

### 2.2 SSTR2 基因治疗联合 5-FU 化疗对肿瘤生长的影响

IV(联合)组肿瘤生长速度最慢,最终肿瘤的大小、重量均显著小于其他3组(图3,表1)。

III,IV 组出现 SSTR2 特异性蛋白目的条带;I,II 组中无特异性蛋白目的条带

图2 Westernblot 结果

I 组

II 组

III 组

IV 组

图3 肿瘤实体图 I 组肿瘤瘤体最大,IV 组瘤体最小。

### 2.3 对胰腺癌细胞凋亡的影响

HE 染色切片中肿瘤凋亡细胞呈空泡状,核浓

缩、碎裂,散在分布。Tunel 图可见 IV 组肿瘤凋亡细胞数目明显增多(图4),凋亡率最高(附表)。

I 组

II 组

III 组

IV 组

图4 Tunel 图(× 400) IV 组肿瘤凋亡细胞数目明显增多,III 组次之,I,II 组最少

附表 SSTR2 基因治疗联合 5-FU 化疗对胰腺癌移植瘤的影响

分组	肿瘤体积(cm <sup>3</sup> )	肿瘤重量(g)	细胞凋亡率(%)
I	2.058 ± 0.176	1.412 ± 0.146	0.56 ± 0.09
II	1.985 ± 0.168	1.352 ± 0.108	0.58 ± 0.12
III	0.318 ± 0.098 <sup>(1),2)</sup>	0.523 ± 0.090 <sup>(1),2)</sup>	1.47 ± 0.13 <sup>(1),2)</sup>
IV	0.134 ± 0.076 <sup>(1),2),3)</sup>	0.322 ± 0.043 <sup>(1),2),3)</sup>	2.17 ± 0.19 <sup>(1),2),3)</sup>

注:1)与I组比较 $P < 0.01$ ,2)与II组比较 $P < 0.01$ ,3)与III组比较 $P < 0.01$

### 3 讨 论

目前,胰腺癌惟一可能治愈的方法依然是手术切除。但手术切除率仅在 10% ~ 15% 左右<sup>[3]</sup>。胰腺癌对常规的放、化疗不敏感,导致其 5 年生存率在 5% 以下<sup>[3]</sup>。因此,寻找新的治疗方法显得尤为必要。国外有研究<sup>[1,3-6]</sup>表明,SSTR2 基因可作为胰腺癌的候选抑癌基因之一,其在胰腺癌细胞中表达后通过不同的机制发挥抑癌作用。笔者等以前的研究<sup>[2,7]</sup>也表明,SSTR2 重新表达后可通过抑制胰腺肿瘤内微血管的生成、抑制癌细胞增殖、抑制转移和诱导癌细胞凋亡等途径发挥治疗作用。5-FU 作为治疗消化系统肿瘤包括胰腺癌的经典化疗药物,也主要是通过诱导癌细胞的凋亡来发挥治疗作用的<sup>[8-9]</sup>。

本实验结果显示,联合治疗组最终移植瘤瘤体大小、重量均显著小于 SSTR2 基因治疗组、5-FU 化疗组及对照组,而细胞凋亡率则显著高于上述 3 组;而单一 SSTR2 基因治疗或 5-FU 化疗对胰腺癌移植瘤影响不大。上述结果表明联合 SSTR2 基因和 5-FU 治疗对 panc-1 胰腺癌移植瘤有显著的协同效应。其可能机制如下:

(1) 化疗药物对胰腺癌细胞的杀伤作用与诱导细胞凋亡密切相关<sup>[8-9]</sup>。5-FU 作为治疗胰腺癌的一线化疗药物,其作用的发挥主要是通过诱导癌细胞凋亡来实现的。细胞凋亡调控主要因子 Bcl-2 蛋白家族中 Bcl-2 和 Bax 的相互作用在凋亡调节过程中起关键作用。Bcl-2 抑制细胞凋亡,Bax 促进细胞凋亡,二者之间的比例决定癌细胞是否发生凋亡。临床和实验研究<sup>[10-11]</sup>中均发现胰腺癌细胞凋亡与 Bcl-2/Bax 比值呈负相关,表明 Bcl-2 和 Bax 在胰腺癌细胞凋亡调节过程中起着重

要作用。有研究<sup>[12]</sup>显示,Bcl-2/Bax 比值低则肿瘤细胞易发生凋亡,对化疗也较为敏感。说明细胞凋亡抗性可能是肿瘤细胞耐药的重要因素。笔者以前的研究<sup>[2]</sup>表明,SSTR2 表达后显著上调 Bax-2 的表达,下调 Bcl-2 的表达。Guillemet 等<sup>[13]</sup>的研究结果也表明 SSTR2 表达后下调 Bcl-2 的表达。因此,SSTR2 表达后不仅能显著增加胰腺癌细胞的凋亡,同时可以通过下调 Bcl-2/Bax 比值来增加胰腺癌细胞对化疗药物 5-FU 的敏感性。本实验表明,单独的 5-FU 治疗对裸鼠肿瘤的影响微乎其微,肿瘤细胞的凋亡与对照组相比无显著意义。这说明人胰腺癌细胞株 panc-1 对 5-FU 是显著耐药的,而 SSTR2 基因表达后可显著提高在体胰腺癌细胞对化疗药物 5-FU 的敏感性,从而发挥显著的协同效应。

(2) 两者联合还可能通过不同的途径发挥协同作用。笔者以前的研究<sup>[2,7]</sup>表明,SSTR2 表达后可通过胰腺肿瘤内微血管的生成、抑制癌细胞的增殖、抑制转移及癌细胞周期抑制等途径来发挥抑癌效应。而 5-FU 作为细胞毒药物,其还可以直接导致癌细胞发生坏死,病理切片也证实有较多癌细胞坏死崩解。

总之,联合应用 5-FU 化疗和 SSTR2 基因治疗胰腺癌可望成为治疗不可切除胰腺癌的有效手段。SSTR2 基因表达后增加胰腺癌对化疗药物 5-FU 敏感性的机制尚待进一步研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] Celinski SA, Fisher WE, Amaya F, *et al.* Somatostatin receptor gene transfer inhibits established pancreatic cancer xenografts[J]. *J Surg Res*, 2003, 115(1): 41-47.
- [2] Kumar M, Liu ZR, Thapa L, *et al.* Mechanism of inhibition growth of human pancreatic carcinoma implanted in nude mice by somatostatin receptor subtype 2 transfection[J]. *Pancreas*, 2004, 29(2): 141-151.
- [3] Vernejoul F, Faure P, Benali N, *et al.* Antitumor effect of in vivo somatostatin receptor subtype 2 gene transfer in primary and metastatic pancreatic cancer models[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(21): 6124-6131.
- [4] Delesque N, Buscail L, Esteve JP, *et al.* SST2 somatostatin receptor expression reverses tumorigenicity of human pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(5): 956-962.
- [5] Fisher WE, Wu Y, Amaya F, *et al.* Somatostatin receptor subtype 2 gene therapy inhibits pancreatic cancer in vitro[J]. *J Surg Res*, 2002, 105(1): 58-64.

- [6] Rochaix P, Delesque N, Esteve JP, *et al.* Gene therapy for pancreatic carcinoma; local and distant antitumor effects after somatostatin receptor sst2 gene transfer[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(6): 995-1008.
- [7] Kumar M, Liu ZR, Thapa L, *et al.* Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on human pancreatic cancer xenografts[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(11): 2075-2081.
- [8] Kerr JF, Winterford CM, Harnon BV, *et al.* Apoptosis; Its significance in cancer and cancer therapy[J]. *Cancer*, 1994, 74(4): 2013-2026.
- [9] Clark JW, Glicksman AS, Wanebo HJ, *et al.* Systemic and adjuvant therapy for patients with pancreatic carcinoma[J]. *Cancer*, 1996, 78(Suppl3): 688-693.
- [10] 吴晓康, 吴育连, 郑樟栋, 等. 胰腺癌细胞凋亡与 bcl-2, bax 基因的表达[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(3): 171-173.
- [11] 杜卫东, 袁祖荣, 倪泉兴, 等. 5-氟尿嘧啶缓释剂瘤内注射治疗胰腺癌的实验研究和临床研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(5): 355-360.
- [12] Chresta CM, Masters JRW, Hickman JA. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high bax: bcl-2 ratio[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(8): 1834-1841.
- [13] Guillermet J, Saint-Laurent N, Rochaix P, *et al.* Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(1): 155-160.

文章编号:1005-6947(2006)11-0830-01

## · 病例报告 ·

# 颈动脉鞘外侧异位结节性甲状腺肿 1 例

于国志, 许元鸿, 李良庚

(中国医科大学附属第一医院 普外二科, 辽宁 沈阳 11000)

**关键词:** 甲状腺肿, 结节性; 甲状腺/畸形; 病例报告

**中图分类号:** R653.3      **文献标识码:** D

**患者** 女, 44 岁。因发现颈前肿物 7d 入院。专科检查: 左叶甲状腺区可扪及 4 个约 0.5~1.2cm 小肿物, 甲状腺左叶 I° 大小; 于左胸锁乳突肌中段后方可扪及约 1.5cm × 2.0cm 大小肿物, 质略硬, 活动度差, 不随吞咽上下活动。辅助检查: B 超检查发现甲状腺左叶结节性甲状腺肿, 左侧颈内静脉外侧颈下段可见一约 24.2mm × 15.5mm × 20.5mm 大小混合性回声, 其内弱回声无回声各占 50%, 周边可见血管无内向生长, 提示甲状腺左叶结节性甲状腺肿, 左颈部混合性病变, 以液性为主; 颈部 CT 增强扫描发现左叶甲状腺内结节性病变伴轻度钙化, 左颈动脉间隙内囊性低密度灶, 边界较清楚, 增强扫描壁有

明显钙化, 呈类圆形直径约 1.5cm, 考虑为左甲状腺腺瘤伴颈部淋巴结转移。诊断: (1) 左叶结节性甲状腺肿 (不排除恶变); (2) 左颈部肿物 (淋巴结转移可能大)。于 2006 年 4 月 6 日全麻下行手术探查, 术中见左叶甲状腺 4 个约 0.5~1.2cm 结节, 切除送冷冻病理检查, 报告为结节性甲状腺伴微小乳头状癌。探查左胸锁乳突肌后方颈内静脉外侧一约 2.5cm × 2.0cm 肿物与颈内静脉紧密相连, 质略硬, 切除送冷冻病理检查, 报告为左颈部结节性甲状腺肿囊性变。遂行左叶甲状腺次全切除峡部切除、左颈部异位甲状腺切除、颈部淋巴结廓清术。术后石蜡病理切片报告与冷冻病理结果一致。

**讨论** 大多数人认为, 异位甲状腺是甲状腺在胚胎发育和甲状腺原基位置异常, 甲状腺舌管下降过程中发生障碍所致, 可发生在甲状腺下降过程的任何部位, 最常见为舌根部大约占 90% 以上, 其次为舌骨上、舌骨前、舌骨下、上纵隔等, 但限于颈动脉鞘内侧、侧方异位甲状腺临床极罕见。侧

方异位甲状腺为甲状腺异位于颈动脉鞘外侧, 如本例。异位甲状腺从形态上可分为 3 类: (1) 真性异位, 异位和正常位置同时存在甲状腺组织; (2) 假性异位, 异位甲状腺是正常甲状腺的延伸; (3) 完全异位, 正常位置缺如, 仅有异位甲状腺组织。也有文献认为异位甲状腺可分为 2 类: (1) 迷走甲状腺, 正常位置缺如的异位甲状腺组织; (2) 副甲状腺, 除正常位置甲状腺外还存在其他位置甲状腺组织。本例异位甲状腺属于真性异位甲状腺或副甲状腺。该病一般在体检或异位甲状腺发生病变时发现, 确诊一般主要通过病史, 临床表现, 体检及辅助检查, 其中辅助检查中 CT 及 B 超有一定作用, 核素  $I^{131}$  扫描和吸碘功能对确定正常部位或异位甲状腺的功能状态有着特异性意义, 对术前诊断及指导手术也有一定临床意义。临床医生对待颈部肿物不能简单定论, 要有异位甲状腺的概念。未扪及正常位置甲状腺的病例, 更应有异位甲状腺的概念。

**收稿日期:** 2006-08-22。

**作者简介:** 于国志, 男, 黑龙江大庆人, 中国医科大学附属第一医院硕士研究生, 主要从事胆囊癌及胰腺癌的诊断与治疗方面的研究。

**通讯作者:** 许元鸿