

文章编号:1005-6947(2007)04-0331-04

· 基础研究 ·

# 多烯紫杉醇靶向放疗增敏对结肠癌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响

王庆伟, 刘宏, 吕惠兰, 张学锋, 程孝国

(山东大学齐鲁医院 肿瘤中心放疗科, 山东 济南 250012)

**摘要:**目的 探讨免疫脂质化的多烯紫杉醇在 LoVo 细胞放射增敏过程中, 对其凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响。方法 制备偶联癌胚抗原(CEA)抗体的多烯紫杉醇脂质体, 作用于 LoVo 细胞后再经 2Gy 照射, 然后再进行相关检测: DNA 末端原位标记染色法(TUNEL) 计算凋亡指数(AI); 检测 p53 和 Bax 和 Bcl-2, Fas, FasL 及 survivin 的表达。结果 多烯紫杉醇免疫脂质体联合放射组(A组) LoVo 的 AI 为  $(43.6 \pm 5.2)\%$ , 均显著高于多烯紫杉醇脂质体联合放射组(B组)  $(17.7 \pm 3.9)\%$  及单纯放射组(C组)  $(16.8 \pm 3.5)\%$  ( $P < 0.01$ )。而 B、C 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。A 组的 Bax, Fas 和 FasL 的表达显著高于 B 组; 而 A 组的 survivin 的表达显著低于 B 组( $P < 0.01$ ), 但两组对 p53 和 Bcl-2 表达影响均无明显差异。结论 多烯紫杉醇经多种通路调节细胞凋亡, 并能增加肿瘤细胞的放疗敏感性。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(4): 331-334]

**关键词:** 多烯紫杉醇; 结直肠肿瘤; 细胞凋亡; 放射疗法

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

## The effect of immunoliposomal docetaxel in combination with radiation on the expression of apoptosis-related proteins in LoVo cell line

WANG Qing-wei, LIU Hong, LU Hui-lan, ZHANG Xue-feng, CHENG Xiao-guo

(Cancer Research Center, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate immunoliposomal docetaxel in combination with radiation on the expression of apoptosis-related proteins in LoVo cell line. **Methods** Immunoliposomal docetaxel was prepared by coupled CEA antibody. LoVo cells were treated with immunoliposomal docetaxel and irradiation (group A), or with liposomal docetaxel and irradiation (group B), or irradiation alone (group C). The apoptosis index (AI) was evaluated by TUNEL method. The expressions of proteins p53, Bcl-2 and Bax were detected by flow cytometry. Fas, FasL and survivin proteins were detected by immunohistochemical staining and were quantified using semi-quantitative analysis by image analysis system. **Results** AI in group A (43.6%) was significantly higher than that in group B (17.7%) and group C (16.8%) ( $P < 0.01$ ), but no significant difference between group B and group C ( $P > 0.05$ ). Bax, Fas and FasL expression in group A were significantly higher than those in group B, but survivin expression in group A was lower than that in group B ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Different pathways are involved in promotion of apoptosis in cancer cells that undergo docetaxel treatment, and docetaxel can enhance LoVo cells radiosensitization. [Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(4): 331-334]

**Key words:** Docetaxel; Colorectal Neoplasms; Apoptosis; Radiotherapy

CLC number: 735.3

Document code: A

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672433)。

收稿日期: 2006-04-05; 修订日期: 2006-09-01。

作者简介: 王庆伟, 女, 山东潍坊人, 山东大学齐鲁医院副主任医师, 主要从事肿瘤的放射治疗方面的研究。

通讯作者: 王庆伟 E-mail: wangqingwei@cscs.org.cn

多烯紫杉醇已经被证明具有放射增敏作用<sup>[1-2]</sup>。脂质体作为药物载体可以提高药物的治疗指数,但其分布缺乏选择性。研究<sup>[3]</sup>证明,多烯紫杉醇脂质体与抗癌胚抗原(CEA)的特异性抗体偶联,作用于体外培养表达 CEA 的人结肠腺癌 LoVo 细胞,可特异的与其结合并具有放射增敏作用。本研究观察其照射后细胞凋亡过程中某些凋亡相关蛋白的变化,以期探讨多烯紫杉醇对 LoVo 细胞靶向放射增敏的分子途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

多烯紫杉醇由浙江恒瑞药业惠赠。表达 CEA 的人结肠癌细胞株 LoVo 购自中科院细胞所。原位缺如末端标记 (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling, TUNEL) 试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。鼠抗人 Fas, FasL, p53, Bcl-2 和 Bax 单克隆抗体均为华美公司产品。IgG-HRP 和 IgG-FITC 羊抗鼠单抗购自中山试剂公司。流式细胞仪 (FACScan, USA)。

### 1.2 多烯紫杉醇免疫脂质体的制备<sup>[4]</sup>

利用氰尿酸氯、PEG-3000 和 DPPE 制备氰尿酸酰化-PEG-PE。将大豆卵磷脂与胆固醇(摩尔比 2:1)和 0.5 mmol 的氰司法部酰化-PEG-PE 与 1 μmol 多烯紫杉醇充分反应,并通过 200nm 的聚酯滤膜制备脂质化多烯紫杉醇。多烯紫杉醇脂质体与抗 CEA 抗体(1 000:1)在 0.15 mol/L NaCl (pH8.8)缓冲液中偶联。用 Sepharose 4B 纯化多烯紫杉醇免疫脂质体。

### 1.3 细胞培养及处理

将 LoVo 细胞置于 10% 小牛血清的 DMEM 中, 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。经 2 nmol/L 多烯紫杉醇免疫脂质体或 2 nmol/L 的多烯紫杉醇脂质体作用细胞 2h 后,充分洗涤未结合之药物, 1.3 Gy/min 剂量率, 2 Gy 的剂量照射后,继续培养 24h,再进行检测。未加药物单纯照射者为对照组。

### 1.4 检测项目及方法

1.4.1 DNA 末端原位标记染色法(TUNEL)检测细胞凋亡 取不同实验条件下处理后的悬浮 LoVo 细胞,4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 缓冲液洗涤 3 次。3 ml/L 过氧化氢-甲醛溶液处理,室温 30 min。预冷的 Triton-X 100 处理,2 min, PBS 洗涤。按药盒说明书步骤进行,每孔中分别加入

TUNEL 反应液 50 μL, 37°C 水浴 60 min, PBS 洗涤。各孔分别加入 POD 液 50 μL, 37°C 水浴 30 min, PBS 洗涤。各孔分别加入 50 μL 的 DAB-过氧化氢液,显色 15 min,光镜下观察细胞凋亡情况。光镜下计算凋亡指数(AI),计算方法:取 5 个高倍镜 > 视野(共 1 000 个细胞),分别计数总细胞和凋亡细胞数量, AI = 凋亡细胞数 / 总细胞数 × 100%。

1.4.2 免疫组织化学(免疫组化)检测 胰酶消化作用后的 LoVo 细胞,置于盖玻片上,95% 酒精固定,免疫组化染色。分别用 survivin, Fas 及 FasL, Bax 单抗孵育 1h,再以生物素标记的二抗作用 1h。DAB 显色,苏木素复染。中性树胶封固,镜检。采用高清晰度彩色全自动细胞图象 JD801 形态分析系统对免疫组化的彩色图像进行半定量分析。

1.4.3 流式细胞分析 经药物和放射处理后的 LoVo 细胞温育 24h,制成单细胞悬液,70% 乙醇固定 2h。取细胞悬液,分别加入 p53, Bax, Bcl-2 单克隆抗体作用 1h。加入 IgG-FITC 作用 30 min。加碘化吡啶(PI)染色液,4°C 孵育 30 min,流式细胞仪检测。检测 PI 荧光和 FITC 荧光信号,所测数据用 Cell quest 软件处理。

### 1.5 统计分析

用 SPSS10.0 统计软件进行分析。数据表达采用均数 ± 标准差,两样本均数比较用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 细胞凋亡的检测结果

凋亡细胞 TUNEL 染色表现为细胞核呈棕黄色染色。阳性反应产物在凋亡细胞内呈不均匀分布,近核膜处着色较深,核中央着色较浅,核固缩则染色质呈块状集聚(图 1)。多烯紫杉醇免疫脂质体 + 照射组(A组)的 LoVo 细胞凋亡率为 (43.6 ± 5.2)%,均显著高于多烯紫杉醇脂质体 + 照射组(B组)的 (17.7 ± 3.9)% 及单纯照射组(C组)的 (16.8 ± 3.5)% (*P* < 0.01)。而 B, C 组间差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

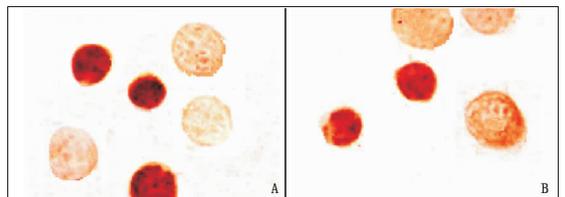


图 1 LoVo 细胞的 TUNEL 染色 A 组:多烯紫杉醇免疫脂质体 + 照射; B 组:多烯紫杉醇脂质体 + 照射

## 2.2 多烯紫杉醇免疫脂质体联合放射对 Fas、Fas L 及 survivin 表达的影响

A 组的 Fas 和 FasL 积分光度值均显著高于 B 组 ( $P < 0.01$ ), 但 A 组的 survivin 积分度值均显著低于 B 组 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。

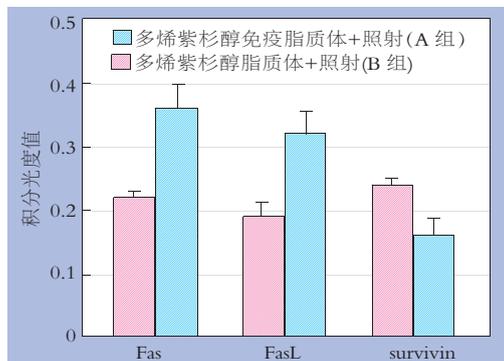


图 2 A, B 组 Fas, FasL, survivin 蛋白免疫组化染色

## 3 讨论

结直肠癌主要治疗手段为手术治疗, 辅助放疗化疗已证明能提高手术切除率和术后生存率、降低复发率<sup>[5]</sup>。然而结直肠癌是相对放射抗拒的肿瘤, 提高其放疗敏感性是一个亟需解决的问题。多烯紫杉醇作为半合成紫杉类抗肿瘤药物具有放射增敏作用。脂质体作为药物载体可以提高药物的治疗指数, 降低毒性, 减轻变态反应。抗体介导脂质体具有靶向性, 联接抗体的脂质体较传统的脂质体靶向结合作用更强<sup>[6]</sup>。CEA 是一种位于肿瘤细胞膜上的肿瘤相关抗原, 在大肠癌中表达最强; LoVo 细胞为表达 CEA 的人结肠腺癌细胞株。研究<sup>[3]</sup>证明, 将脂质化的多烯紫杉醇与抗 CEA 抗体偶联, 可特异地与肿瘤细胞上的 CEA 结合, 所制备的多烯紫杉醇免疫脂质体具有特异的寻靶功能, 对体外培养的 LoVo 细胞具有放射增敏作用, 而对照组因缺乏 CEA 抗体的靶向作用, 使药物无法与 LoVo 细胞特异性结合。有研究<sup>[7]</sup>显示, 多烯紫杉醇主要是通过阻滞细胞于 G<sub>2</sub> ~ M 期而起到放射增敏的作用。本实验探讨其通过凋亡引起 LoVo 细胞放射敏感性改变的分子途径。对于实验中选择的 2 nmol/L 多烯紫杉醇为 LD50 的 1/5。

凋亡细胞 TUNEL 染色显示, A 组与 B 组及 C 组相比, LoVo 细胞的凋亡率明显提高。而没偶联 CEA 抗体的药物缺乏特异的结合, 经因充分洗涤

## 2.3 p53, Bax, Bcl-2 蛋白的表达

A 组和 B 组的 p53 和 Bcl-2 表达差异无统计学意义, 但 A 组的 Bax 表达显著高于 B 组 ( $P < 0.01$ )。

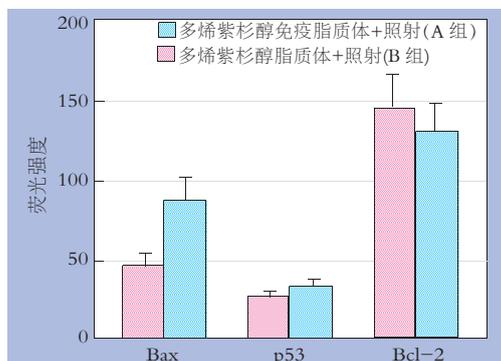


图 3 A, B 组 p53, Bax, Bcl-2 蛋白表达的流式细胞检测

后, 无法发挥其增敏作用, 与单纯放射组相比凋亡率无明显差异。

流式细胞检测结果证实, 多烯紫杉醇免疫脂质体联合放射组与多烯紫杉醇非免疫脂质体联合放射组相对 p53 和 Bcl-2 表达均没有明显影响, 却显著提高了 Bax 的表达。说明多烯紫杉醇的放射增敏不是通过 p53 途径诱导细胞凋亡而实现的。Bcl-2 与 Bax 比值降低可能是多烯紫杉醇导致 LoVo 细胞趋向于凋亡和放射敏感的原因之一。

本研究结果表明多烯紫杉醇免疫脂质体可使 Fas 和 FasL 的表达显著上调, 诱导细胞凋亡, 增敏细胞的放射效应。survivin 具有抑制凋亡的作用, 是预测大肠癌发生、发展及预后的新指标。survivin 的表达与结直肠癌细胞的放射和化疗抗拒程度有关<sup>[8]</sup>。结果显示, 多烯紫杉醇使 LoVo 细胞 survivin 的表达下调, 减少了对细胞凋亡的拮抗, 由此可以解释诱导凋亡增加 LoVo 细胞的放射敏感性。

本研究的结果表明, 多烯紫杉醇通过多种信号传导途径的分子调节细胞凋亡, 增加肿瘤细胞的放射敏感性。此可为多烯紫杉醇增敏结直肠癌放射治疗提供实验依据。

## 参考文献:

- [1] Kim JC, Saha D, Cao Q, et al. Enhancement of radiation effects by combined docetaxel and flavopiridol treatment in lung cancer cells [J]. Radiotherapy and Oncology, 2004, 71 (2): 213 - 221.

- [2] Yang LX, Wang HJ, Holton RA. In vitro efficacy of a novel chemoradiopotentiator-taxoltere metro [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 46(1): 159-163.
- [3] 王伟伟, 刘宏, 吕惠兰, 等. 多烯紫杉醇免疫脂质体对结肠癌细胞的靶向放射增敏作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(7): 795-797.
- [4] Wang QW, Lu HL, Song CC, *et al.* Radiosensitivity of human colon cancer cell enhanced by immunoliposomal docetaxel [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(26): 4003-4007.
- [5] 晏仲舒. 进一步提高大肠癌的治疗效果[J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(6): 481-483.
- [6] Bendas G, Krause A, Bakowsky U, *et al.* Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique [J]. *Int J Pharm*, 1999, 181(1): 79-93.
- [7] Dunne AL, Motherstill C, Robson T, *et al.* Radiosensitization of colon cancer cell lines by docetaxel: mechanisms of action [J]. *Oncol Res*, 2004, 14(2): 447-454.
- [8] Rodel C, Haas J, Groth A, *et al.* Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: survivin as a radioresistance factor [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 55(5): 1341-1347.

文章编号: 1005-6947(2007)04-0334-01

· 病案报告 ·

## 席汉氏综合征右半结肠切除 1 例

梁勇, 师龙生, 王磊

(解放军第四七四医院 外一科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

**关键词:** 垂体功能减退症; 结肠切除术; 病例报告

**中图分类号:** R584

**文献标识码:** D

**患者** 女, 73岁。因发现右下腹包块 1 个月, 间歇性腹痛 7d 伴发热 5d 入院。患者于 30 年前因产后大出血导致席汉氏综合征, 一直服用强的松及甲状腺片治疗。体查: 一般情况尚可, 典型席汉氏综合征体征。右下腹可触及一大小约 5cm × 5cm × 4cm 包块, 质硬, 边界清, 活动度可, 有轻压痛、无反跳痛, 余无阳性体征。红细胞:  $3.42 \times 10^{12}/L$ , 血红蛋白: 105g/L; 促甲状腺激素: 6.10IU/mL, 血游离三碘甲状腺原氨酸 1.39nq/mL, 血游离甲状腺素 0.26nq/dL;  $K^+$  3.39mmol/L,  $Na^+$  131mmol/L,  $Cl^-$  99mmol/L; 总蛋白 48g/L, 清蛋白 25g/L, 清球比值 1.00, 血糖 5.2mmol/L; 腹部 CT: 考虑为结肠癌;

心、肺功能及各项化验检查未见明显异常。术前给予口服强的松: 早 5mg, 晚 2.5mg; 优甲乐 12.5mg/d; 纠正钾、钠、血糖至正常水平, 同时补充适量人血白蛋白、血浆, 纠正低蛋白血症。术前 2d 给予抗生素, 充分准备后全麻下行“剖腹探查、右半结肠切除术”。术后住监护病房, 除按结肠术后常规处理外, 监测血糖 1 次/1~2h, 电解质 2 次/d, 随时调整氯化钠、葡萄糖用量。手术当天、术后 1, 2, 3d 分别给予氢化考的松 200, 100, 100, 50mg 静脉点滴, 术后第 4 天改术前口服剂量。患者恢复顺利, 治愈出院。病理报告: 结肠溃疡。随诊 2 个月康复好。

**讨论** 席汉氏综合征是由于各种原因(产后大出血, 产褥热或 DIC)引起垂体门脉系统缺血、缺氧, 坏死、萎缩。体内多种激素缺乏使之不能满足人体基础或生理、应激等情况的需要所致的临床综合征群。可出现甲状腺功能低下、肾上腺功能不足、促性腺激素及泌乳素不足的表现, 多

需长期服用相应激素维持。此类患者内分泌功能紊乱, 易造成患者内环境不稳定, 发生低钠、低钾、低血糖等。且营养状态不佳, 体质弱。手术耐受能力差, 术后并发症发生率高, 尤其是可能发生致命的垂体危象、卒中。故围手术期处理极为重要。笔者的体会是: (1) 术前全面检查, 充分准备, 需调整钾、钠、血糖至正常水平。贫血和低蛋白血症应基本纠正, 使席汉氏综合征症状、体征明显缓解, 且无其他手术禁忌; (2) 尽可能减少应激反应程度, 术中麻醉平稳, 保证治疗效果的情况下, 手术力求简单, 术后镇痛; (3) 术前、术后采用口服或静滴注补充甲状腺素和皮质激素, 维持正常代谢。并使用抗生素; (4) 注意保暖, 并观察体温变化; (5) 术后除按术后常规处理外, 要严密监测生命体征及血糖(1 次/1-2h), 电解质(2 次/d), 并随时调整糖、盐用量, 保证各项监测指标正常, 维持内环境稳定; (6) 控制体液量和补液速度, 既要防止补液不足, 更要防止补液过量, 尤其注意循环、呼吸稳定。

**收稿日期:** 2007-01-22。

**作者简介:** 梁勇, 男, 河北东光人, 新疆乌鲁木齐解放军四七四医院外一科住院医师, 主要从事胃肠外科方面的研究。

**通讯作者:** 梁勇 E-mail: liangyong

0518@126.com