文章编号:1000-5404(2007)04-0311-03

论著

不同剂量环磷酰胺对裸鼠A549细胞移植瘤凋亡的影响

盛伟利,梅同华 (重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010)

提 要:目的 探讨小剂量环磷酰胺对裸鼠肺腺癌移植瘤凋亡的影响。**方法** 建立裸鼠人肺腺癌移植瘤模型,不同剂量环磷酰胺干预,测定抑瘤效果和副作用,免疫组化检测NF-κB P65表达,电镜、TUNEL检测肿瘤细胞凋亡情况。**结果** 小剂量组经环磷酰胺处理后肿瘤体积与大剂量组和对照组相比明显减小;电镜下出现典型凋亡小体,凋亡指数明显增高($P<0.05$)而P65蛋白表达比对照组显著减少($P<0.05$)。**结论** 小剂量环磷酰胺能抑制肺癌移植瘤增长,诱导肿瘤细胞凋亡,可能与下调NF-κB信号传导途径有关。

关键词:肺肿瘤;凋亡;环磷酰胺
中图法分类号:R73-361;R734.2;R979.1 **文献标识码**:A

Effect of low-dose cyclophosphamide on cell apoptosis of implanted human lung carcinoma in nude mice

SHENG Wei-li, MEI Tong-hua (Department of Respiratory Diseases, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of low-dose cyclophosphamide (CTX) on apoptosis of implanted human lung carcinoma in nude mice. **Methods** BALB/c nude mice bearing lung carcinoma were randomized into several groups, each receiving different dose of CTX respectively. We investigated antitumor effect and toxicity of CTX. At the end of experiment, tumors were resected for immunohistochemical staining. Nuclear factor κB (NF-κB P65) was detected and apoptosis was measured by TUNEL. Morphological changes of tumor cells were observed. **Results** The volume of tumors was much smaller in mice receiving continuous low-dose CTX than that receiving maximally tolerated dose of CTX and normal saline (control group). The apoptotic index was increased and NF-κB P65 decreased in the mice receiving low-dose of CTX. **Conclusion** The continuous low-dose of CTX inhibits the growth of implanted tumor and increases tumor cell apoptosis, which may be due to the down-regulation of nuclear factor κB.

Key words: lung neoplasms; apoptosis; cyclophosphamide

环磷酰胺是目前临床治疗肺癌常用的化疗药物,常规化疗产生严重副作用。小剂量(通常是最大剂量的1/10~1/3)、高频率(如1~3次/周)疗法可以通过抑制新生血管的生成,抑制肿瘤细胞的增长[1-3],对于环磷酰胺诱导细胞凋亡方面,国内研究甚少。本实验建立肺癌裸鼠移植瘤,不同剂量环磷酰胺干预,观察细胞凋亡情况,并对其机制进行探讨。

基金项目:重庆市卫生局资助项目(200453)
Supported by the Bureau of Public Health of Chongqing (200453)
作者简介:盛伟利(1978-),男,山东省济宁市人,硕士,医师,主要从事肺癌早期诊断与临床治疗方面的研究,现在北京市大兴区人民医院呼吸内科。电话:(023)63706447,E-mail: shwl123@eyou.com
通讯作者:梅同华, E-mail: mtonghua@163.com
收稿日期:2006-03-14;**修回日期**:2006-11-14

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640培养液和小牛血清(杭州四季青),鼠抗人NF-κB P65单抗、S-P染色试剂盒、原位细胞凋亡检测(TUNEL)试剂盒(北京中山公司),联苯二氨(DAB)显色试剂盒(武汉博士德公司),环磷酰胺(上海华联制药公司)。

1.2 动物模型的建立

BALB/c-nu/nu品系的裸小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于重庆医科大学动物室SPF条件下的超净层流室中。裸鼠20只,4~6周龄,体质量18~20 g,雌雄各半。人肺腺癌(A549)细胞株购于天津医科大学肿瘤中心,取处于对数生长期的A549细胞以0.25%胰酶消化,Hanks液洗涤,调整至1×10^7个/ml,按每只0.1 ml接种于裸鼠右侧季肋皮下。

1.3 分组实验与观察

分4组，每组5只。空白对照组：只给予生理盐水（3次/周）；大剂量组：环磷酰胺（100 mg/kg，1次/周）；中剂量、高频率组：环磷酰胺（40 mg/kg，3次/周）；小剂量、高频率组：环磷酰胺（25 mg/kg，3次/周）。局部肿瘤长至150～200 mm^3时，腹腔注射给予药物干预。每周测量1次瘤体长径和短径，计算瘤体积（应用公式：体积＝短径^2×长径/2），绘制各组肿瘤生长曲线；实验结束称肿瘤质量，计算抑瘤率，抑瘤率（%）＝（对照组瘤平均质量－用药组瘤平均质量）/对照组瘤平均质量×100%。

1.4 标本检测

①标本常规甲醛固定，石蜡包埋切片，苏木精-伊红（HE）染色，光镜下观察。②新鲜标本4%戊二酸固定脱水，树脂包埋切片，透射电镜下观察细胞超微结构并摄像。③标本脱蜡后原位细胞凋亡（TUNEL）检测凋亡情况，细胞核中着色棕黄色颗粒状为阳性细胞，即凋亡细胞。按染色强度判断阳性程度，阴性（－）：无色；弱阳性（＋）：浅黄色；阳性（＋＋）：棕黄色；强阳性（＋＋＋）：棕褐色。观察5个高倍镜下凋亡细胞数，不少于1 000个细胞，计算凋亡指数（apoptotic index，AI），AI（%）＝凋亡细胞数/观察细胞总数×100%。④免疫组织化学染色（S-P法染色，操作步骤按试剂盒要求进行）检测肿瘤NF-κB P65表达情况，NF-κB P65为胞质着色，阳性表达为肿瘤细胞细胞质棕黄色颗粒。观察5个高倍镜下染色细胞，计数P65阳性细胞密度。

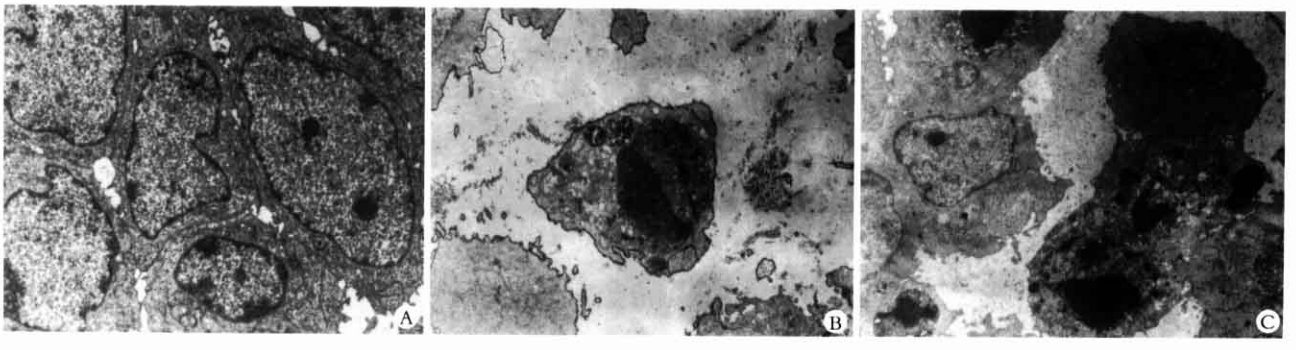
1.5 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件对实验数据行方差分析、S-N-K检验。

2 结果

2.1 裸鼠皮下移植瘤模型建立及鉴定

所有接种人肺腺癌细胞系A549的裸鼠在7～10 d均能成瘤。HE染色光镜下见对照组细胞核形态不规则，核浆比例大，核分裂多见；大剂量组有坏死细胞，细胞分化较差；小剂量组有凋亡肿瘤细胞。电镜下见对照组细胞细胞器丰富，细胞核不规则，核浆比例增大；大剂量组表面绒毛减少、断裂，粗面内质网颗粒减少，线粒体肿胀，胞质内出现部分凋亡小体；小剂量组见细胞表面绒毛减少、消失，核固缩，深染，有较多凋亡小体。见图1。



A：对照组；B：大剂量组；C：小剂量组

图1 裸鼠移植瘤细胞超微结构改变 （TEM×6 000）

2.2 肿瘤生长及裸鼠体质量观察

对照组肿瘤呈持续快速生长，生长曲线陡直，实验结束时体积为（18 500±730）mm^3；大剂量组用药后肿瘤生长较慢，1周后逐渐加快，实验结束时体积从（1 270±160）mm^3增大至（11 600±450）mm^3；中、小剂量组肿瘤用药后生长较快，1周后生长速度减缓，中剂量组体积从（1 350±165）mm^3变化为（6 250±270）mm^3，小剂量组从（1 390±170）mm^3变化为（4 850±245）mm^3，与对照组和大剂量组相比明显减小。对照组裸鼠体质量变化不大，但精神较差，身体虚弱。中、小剂量组裸鼠体质量下降不明显、精神较好；大剂量组体质量明显下降从（19.5±1.6）g变为（14.6±1.2）g，精神差，身体极度虚弱。

2.3 裸鼠移植瘤质量比较及抑瘤率

大剂量组移植瘤质量（1.35±0.38）g小于对照组（2.10±0.42）g（$P<0.05$）；而中剂量组移植瘤质量（0.87±0.28）g显著小于大剂量组（$P<0.05$）；小剂量组移植瘤（0.83±0.25）g与对照组比较有显著性差异（$P<0.01$）。中、小剂量组抑瘤率分别为58.57%和60.48%显著高于大剂量组35.71%（$P<0.01$）。

2.4 TUNEL示肿瘤细胞凋亡情况

凋亡细胞在各组肺癌组织中均有不同程度表达，多为散在分布，部分可呈局灶性。对照组见少量凋亡细胞，大剂量治疗组凋亡细胞明显增多，散在分布，小剂量治疗组凋亡细胞最多，呈片状分布。

2.5 免疫组化NF-κB P65与凋亡指数

P65蛋白阳性位于细胞浆，呈棕黄色颗粒状。大剂量组肿瘤组织中NF-κB P65蛋白表达较低，与对照组相比有显著性差异（$P<0.05$）；而中剂量组P65蛋白表达明显低于大剂量组（$P<0.05$）；小剂量组P65蛋白表达明显低于对照组（$P<0.01$）。大剂量组裸鼠移植瘤细胞凋亡指数明显高于对照组（$P<0.05$）；而中剂量组凋亡指数明显高于大剂量组（$P<0.05$），小剂量组凋亡指数与对照组相比有显著性差异（$P<0.01$）。见表1。

表 1　化疗药物对各组细胞凋亡的影响[$n=5$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	NF-κB P65	凋亡指数
对照组	37.13 ± 3.90	5.68 ± 0.70
大剂量组	24.74 ± 3.06[a]	7.96 ± 0.83[a]
中剂量组	17.12 ± 2.88[b]	16.24 ± 1.51[b]
小剂量组	15.68 ± 2.72[a]	17.93 ± 2.16[a]

a：$P<0.05$，$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与大剂量组比较

3　讨论

临床广泛采用常规剂量或大剂量化疗药物治疗肺癌，环磷酰胺在治疗中发挥了重要的作用，但其在杀伤肺癌细胞的同时也对正常组织器官造成一定的损害。目前，小剂量、高频率疗法通过抑制血管内皮的生长，增加血管内皮细胞的凋亡，减少肿瘤血液供应，达到抑制肿瘤生长的目的。Man 等[4]研究发现：每日口服小剂量环磷酰胺(20 mg·kg^{-1}·d^{-1}和25 mg·kg^{-1}·d^{-1})治疗大肠癌、乳腺癌、前列腺癌的荷瘤小鼠肿瘤模型，结果成功地抑制了瘤体的生长。还发现将复发后的瘤体细胞移植到新的荷瘤小鼠上，以同样的治疗方案(即每日口服小剂量环磷酰胺)治疗可再次获得缓解，没有耐药性的产生。临床研究表明，对 MTD 剂量(75～100 mg/m^2)的顺铂治疗失败的 27 例非小细胞肺癌患者接受同样药物的低剂量(60 mg/m^2)治疗后，生存时间延长，副作用明显减少。同样，一些乳腺癌患者对 MTD 剂量(100 mg/m^2)的多西紫杉醇每 3 周给药治疗无效后，对同样药物的 1/3 MTD 剂量每周(20～40 mg/m^2)给药有效[5,6]。

本研究显示：中、小剂量组肿瘤体积明显小于大剂量组，考虑大剂量组裸鼠出现了耐药性，小剂量组化疗抑制肿瘤血管生成持续抑制肿瘤细胞增长达到稳定肿瘤的效果。从化疗副作用来看：大剂量组裸鼠体质量持续减轻，小剂量组裸鼠体质量减轻不明显，说明裸鼠对化疗依从性较强，耐受性较好。凋亡是细胞程序性死亡，在肿瘤生长过程中可以出现少量的凋亡细胞，当给予环磷酰胺干预后，大部分的肿瘤细胞被阻断在 S 期和 G_2M 期，形态学上出现了典型的凋亡细胞和凋亡小体[7]。本实验表明：环磷酰胺通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制肿瘤生长。实验结果还显示小剂量组 P65 蛋白表达比大剂量组和对照组明显减少，与细胞凋亡指数呈负相关，这说明对照组和大剂量组存在 NF-κB P65 活性，抑制了肿瘤细胞的凋亡，而小剂量组可能通过下调 NF-κB 途径诱导细胞凋亡。杨柳芹等[8]研究发现通过抑制胃癌细胞 NF-κB 的表达可提高胃癌细胞对凋亡诱导分子 TRAIL 的敏感性，从而促进胃癌细胞的凋亡，与我们的结果一致。另外，除小剂量化疗通过诱导肿瘤细胞的凋亡抑制肿瘤生长外，可能还有其他机制的参与。如通过抑制树突状细胞的成熟和功能作用于机体免疫系统[9]，也可以通过 NF-κB 途径减少 VEGF 的生成，抑制血管内皮生成，阻断肿瘤细胞血液供应，我们前期工作就证明了这一点。

总之，小剂量化疗通过多种途径抑制肿瘤生长，减少毒副作用，达到带瘤生长的目的，而不是消灭肿瘤，可以为临床治疗肺癌提供了一种新的思路。

参考文献：

[1] Folkman J. Angiogenesis research: from laboratory to clinic[J]. Forum (Genova), 1999, 9(3 Suppl 3): 59－62.

[2] Kerbel R S, Klement G, Pritchard K I. Continuous low－dose anti－angiogenic/ metronomic chemotherapy: from the research laboratory into the oncology clinic[J]. Ann Oncol, 2002, 13(1): 12－15.

[3] Miller K D, Sweeney C J, Sledge G W, *et al*. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangi0genics[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(4): 1195－1206.

[4] Man S, Bocci G, Francia G, *et al*. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water[J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2731－2735.

[5] Nakamura Y, Kunitoh H, Kubota K, *et al*. Retrospective analysis of safety and efficacy of low-dose docetaxel 60 mg/m^2 in advanced non-small cell lung cancer patients previously treated with platinum-based chemotherapy[J]. Am J Clin Oncol, 2003, 26(5): 459－464.

[6] Hainsworth J D, Burris H A, 3rd., Erland J B, *et al*. Phase I trial of docetaxel administered by weekly infusion in patients with advanced refractory cancer[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(6): 2164－2168.

[7] 刘东玉，孔　晶，刘凤仪，等. 化疗药环磷酰胺对癌细胞的细胞周期影响和诱导凋亡作用的研究[J]. 实验动物科学与管理，2005，22(1)：12－14.

[8] 杨柳芹，房殿春. 胃癌细胞 NF-κB 和 survivin 的表达对 TRAIL 抗瘤作用的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(7)：584－586.

[9] Inoshima N, Nakanishi Y, Minami T, *et al*. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(11): 3480－3486.

（编辑　王小寒）