论著

文章编号:1000-5404(2007)18-1760-04

# 持续小剂量化疗对A549肺癌PTEN基因和凋亡的影响

李长毅,张明川,梅同华,厉 明 (重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010)

**提 要:目的** 检测不同剂量环磷酰胺化疗后,荷A549肺腺癌裸鼠皮下肿瘤组织中PTEN的表达及癌细胞凋亡情况。**方法** 右季肋部皮下注射A549细胞悬液,建立荷A549肺腺癌裸鼠模型,分3组,分别给予持续小剂量(low-dose metronomic, LDM)、最大耐受剂量(maximum tolerable dose, MTD)CTX(环磷酰胺)和生理盐水化疗,21 d治疗结束取皮下肿瘤组织,以免疫组化S-P法分别检测3组裸鼠皮下肿瘤组织中PTEN的表达,以TUNEL法检测癌细胞的凋亡。**结果** 化疗14 d后,LDM组瘤体生长明显慢于MTD组和对照组($P<0.05$);化疗第7天开始,LDM组和MTD组裸鼠体质量开始出现减轻($P<0.05$),第21天,MTD组裸鼠体质量显著减轻,3组裸鼠体质量两两相比均有统计学意义($P<0.05$);LDM组PTEN阳性表达及凋亡率均显著高于大剂量组和对照组($P<0.05$)。**结论** 持续小剂量化疗可使癌组织中PTEN表达上调,从而诱导细胞凋亡增多。

**关键词**:化疗;小剂量;肺癌;PTEN;凋亡

**中图法分类号**:R73-361;R730.22;R734.2 **文献标识码**:A

# Low-dose metronomic chemotherapy upregulates PTEN and induces apoptosis of A549 pulmonary adenocarcinoma in athymic mice

LI Chang-yi, ZHANG Ming-chuan, MEI Tong-hua, LI Ming (Department of Respiratory Diseases, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of PTEN protein and apoptosis of tumor cells in tumor graft of human pulmonary adenocarcinoma in athymic mice after chemotherapy (CTX). **Methods** Eighteen athymic BALB/C-nu/nu mice were subcutanously injected under the anterior right leg with cultured A549 cell suspension. Then, all the athymic mice were randomized into 3 groups, respectively receiving 100 mg/kg CTX (low-dose metronomic, LDM) each other day for 3 times, 20 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$ CTX (maximum tolerable dose, MTD) for 21 d and 0.9% NS for 21 d. All athymic mice were killed after chemotherapy, and the obtained tumors were used to detect the expression of PTEN protein by immunohistochemistry and the apoptosis of the tumor cells by TUNEL. **Results** The expression of PTEN protein and apoptosis rate in LDM group were significantly higher than that in MTD group and control group ($P<0.05$). **Conclusion** The low-dose metronomic chemotherapy can upgrade the level of PTEN protein so as to induce the apoptosis of tumor cells consequently.

**Key words**: chemotherapy; low dose; lung cancer; PTEN; apoptosis

持续小剂量化疗(low-dose metronomic chemotherapy, LDM)(亦称节奏性化疗),是近年才提出的一种不同于传统最大耐受量(maximum tolerable dose, MTD)化疗的新治疗模式。它以较传统化疗小得多的剂量持续作用于肿瘤细胞及其基质,可以持续抑制肿瘤细胞的生长,减少耐药的发生和明显抑制肿瘤血管的生成,减轻化疗药物对患者的毒副作用,从而增强患者对化疗的依从性[1-3]。目前大部分关于LDM的研究都集中在关于抑制肿瘤血管生成方面,而对抑癌基因的影响鲜见报道。本实验主要研究LDM化疗对荷A549肺腺癌裸鼠皮下癌组织中抑癌基因PTEN和癌细胞凋亡情况的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

A549肺腺癌细胞株购自重庆医科大学超声研究所;BALB/c-nu/nu裸小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,18只,4~6

基金项目:重庆市卫生局资助课题(200453)
Supported by the Health Bureau of Chongqing(200453)

作者简介:李长毅(1973-),男,四川省安岳县人,硕士,主治医师,主要从事非小细胞肺癌侵袭转移机制方面的研究。电话:(023)637045927,E-mail: LCY740729@263.net

通讯作者:梅同华,E-mail: mtonghua@163.com

收稿日期:2006-10-20;修回日期:2007-01-24

周龄，体质量 19.5～22.5 g，雌性，饲养于重庆医科大学实验动物中心。环磷酰胺（CTX）由江苏恒瑞医药公司生产（批号：国药准字 H32020857）；SP9001 免疫组化二抗试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司；PTEN 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司（货号：#9559），工作浓度 1∶60；TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司（货号：11684817910）。

### 1.2　方法

1.2.1　荷 A549 肺癌裸小鼠模型的建立　　将 A549 肺癌细胞复苏后置于 RPMI1640 培养基中培养并传代，取生长良好的细胞以胰酶消化，用计数板计数，调整浓度至 $1\times10^7$/ml。取 18 只 BALB/c-nu/nu 裸小鼠，每只裸小鼠右季肋部皮下接种 0.1 ml（$1\times10^7$/ml）A549 肺癌细胞，接种 1 周后开始化疗。

1.2.2　化疗实验　　将 18 只荷瘤裸鼠以随机数字表法分成 3 组，每组 6 只。第 1 组（MTD CTX 组）：以 CTX 100 mg/kg 隔日 1 次腹腔注射，连续 3 次；第 2 组（LDM CTX 组）：以 CTX 20 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 腹腔注射，连续 21 d；第 3 组（对照组）：以 0.1 ml 生理盐水每日腹腔注射，连续 21 d。CTX 以生理盐水现用现配。化疗开始及以后每 7 天用游标卡尺测量 1 次肿瘤体积和裸鼠体质量，体积公式：长径×宽径$^2$×0.52[4]。

1.2.3　化疗后肿瘤组织免疫组化染色及凋亡检测　　一疗程化疗结束（21 d）后，脱颈处死动物，剥离皮下肿瘤组织，用 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋后连续 4 μm 切片。采用 S-P 法染色，常规步骤按试剂盒要求进行，切片置 10 mmol/L 枸橼酸缓冲液（pH 6.0）中以微波热修复抗原，滴加兔抗人 PTEN 单抗后 4 ℃过夜，DAB 显色。以 PBS 缓冲液（pH 7.4）代替一抗做阴性对照，已知阳性的切片作阳性对照。TUNEL 检测按试剂盒说明进行。结果判断标准：PTEN 结果判断以细胞质中出现棕黄色并高于背景且无非特异性染色为阳性细胞；TUNEL 结果判断以细胞核出现黄褐色或棕黄色为阳性细胞，每张切片随机选择 5 个高倍视野（×400），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%。

1.2.4　图像分析　　将免疫组化切片置 Nikon TE2000-U 显微镜下（×400），对所测视野进行准确定位后由 MicroPublisher 5.0 RTV 摄像系统提取数值化细胞图像，结果用 ImagePro Plus 5.1 图像分析系统进行处理，处理前以标准台尺图像校准。每张切片随机选取 4 个完整而不重叠的视野进行定量分析，测定 PTEN 蛋白免疫组化反应阳性颗粒的累积光密度和阳性面积，取每张切片的均值作为该例的测量值。

### 1.3　统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析和组间 SNK（$q$）检验。

## 2　结果

### 2.1　肿瘤生长情况

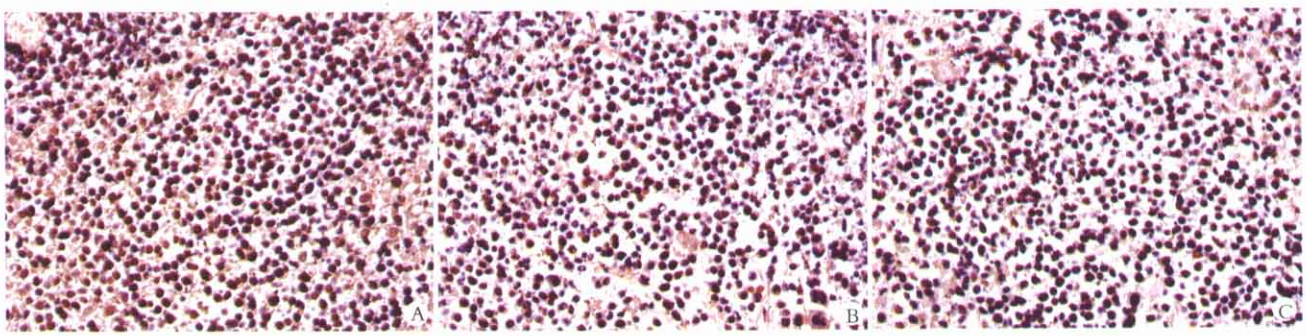
化疗早期，LDM、MTD、对照组各组肿瘤体积无统计学意义［分别为（177.319 ± 14.726）、（172.418 ± 4.290）、（164.949 ± 14.430）$mm^3$，$P>0.05$］；7 d 后，LDM 组和 MTD 组肿瘤均出现生长缓慢，瘤体大小差异无统计学意义［分别为（652.234 ± 47.759）、（706.546 ± 60.687）$mm^3$，$P>0.05$］，但是和对照组比差异有统计学意义［对照组为（1 104.064 ± 89.534）$mm^3$，$P<0.05$］；14 d 后，LDM 组瘤体生长明显慢于 MTD 组和对照组，各组相比差异均有统计学意义［（914.169 ± 53.018）、（1 129.008 ± 33.831）、（2 374.025 ± 201.615）$mm^3$，$P<0.05$］。MTD 组在化疗后期瘤体有加速生长趋势，化疗第 21 天各组肿瘤体积差异显著［（1 091.340 ± 78.176）、（2 281.075 ± 125.709）、（4 484.946 ± 337.184）$mm^3$，$P<0.05$］。

### 2.2　裸鼠体质量的变化

化疗开始（第 0 天）LDM、MTD、对照组裸鼠体质量两两相比差异无统计学意义［（20.917 ± 1.114）、（21.083 ± 1.114）、（21.417 ± 0.970）g，$P>0.05$］；化疗第 7 天，LDM 组和 MTD 组均出现体质量减轻［（20.583 ± 1.242）、（19.667 ± 0.983）g，$P>0.05$］，分别与对照组比有统计学意义［对照组为（22.250 ± 0.758）g，$P<0.05$］；化疗第 14 天，各组裸鼠均出现体质量减轻，以 MTD 组减轻明显，3 组裸鼠体质量两两相比均有统计学意义［分别为（21.167 ± 1.252）、（18.250 ± 0.689）、（21.750 ± 0.880）g，$P<0.05$］；化疗第 21 天，MTD 组裸鼠体质量显著减轻，3 组裸鼠体质量两两相比均有统计学意义［（19.667 ± 1.169）、（17.333 ± 0.753）、（21.083 ± 0.736）g，$P<0.05$］。

### 2.3　PTEN 及凋亡表达差异

PTEN 的阳性表达定位于 A549 肺癌细胞的细胞质呈弥漫性棕黄色或棕褐色颗粒，偶有癌细胞核表达。TUNEL 结果判断以细胞核出现黄褐色或棕黄色为阳性细胞。对阳性细胞进行统计学处理，结果显示：LDM 组分别与 MTD 组和对照组相比，PTEN 的阳性表达和细胞凋亡率差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见图 1、表 1。




A：LDM 组；B：MTD 组；C：对照组

**图 1　LDM、MTD 组和对照组细胞凋亡情况**　（TUNEL×400）

表1 PTEN 基因蛋白表达和细胞凋亡指数 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 阳性面积($\mu m^2$) | 累积光密度 | 细胞凋亡指数(%) |
|---|---|---|---|
| LDM 组 | 355.432±79.552[ab] | 71.745±15.696[ab] | 18.187±1.785[ab] |
| MTD 组 | 156.190±45.908[a] | 28.964±8.871[a] | 9.010±1.348[a] |
| 对照组 | 35.043±15.856 | 6.364±2.844 | 4.716±1.721 |

a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与 MTD 组比较

## 3 讨论

持续小剂量化疗是近年才提出的一种不同于传统最大耐受量化疗的新治疗模式。它是一种颠覆传统的化疗方式。传统化疗通常是给予个体对该种药物的最大耐受剂量,因为化疗药物引起的严重毒副反应,2 次给药之间有至少 3 周的间歇,以便让受到严重抑制的骨髓等器官恢复功能。在 3 周的间歇里,部分受到抑制的肿瘤细胞会逐渐恢复活性,而损伤的血管内皮也会得到修复。与之相反,使用同样的药物以持续小剂量给药的方式化疗,内皮细胞则因为持续受到抑制而没有修复的机会,从而带来持续抑制肿瘤血管生长的效应。一系列研究表明,部分即使对 MTD 化疗发生耐药的肿瘤细胞,会因持续小剂量化疗而对耐药的药物变得重新敏感。这也许与持续小剂量化疗使内皮细胞的遗传稳定性发生改变,从而改变了药物作用的靶位有关[5]。Mariani 等[6]用尿嘧啶氮芥/呋氟尿嘧啶以每天小剂量给药的方式治疗早期肺癌(T2),在长达 2 年的时间里,出现 3 级毒性的患者只占 2%。持续小剂量化疗对肿瘤生长的抑制随着化疗时间的延长而越发明显,14 d 后,LDM 组瘤体生长明显慢于 MTD 组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。且 MTD 组在化疗后期瘤体有加速生长趋势。说明小剂量化疗对肿瘤生长抑制明显强于大剂量化疗,且副作用小,安全性高,和以往报道一致。

目前国内外对 LDM 化疗的研究基本都是关于对肿瘤血管抑制方面的,而关于 LDM 化疗对抑癌基因 PTEN 以及凋亡的研究鲜见报道。据 Browder 等[5]报道,20 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$是环磷酰胺抑制 VEGFR-2 的最佳剂量,本研究以此为依据,采用腹腔给药的方式,按 20 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$的剂量给予环磷酰胺,探索 LDM 化疗与 PTEN 以及细胞凋亡之间的关系。

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)是 1997 年发现的一个新抑癌基因。它位于染色体 10q23.3,可作为脂质磷酸酶,负性调控 PI3K/AKT 通路,调控细胞 $G_1$ 期阻滞和细胞凋亡;也可作为蛋白磷酸脂酶,抑制 MAPK 信号通路[7]。免疫组织化学表明,PTEN 在细胞内的分布因为组织不同而不同[8]。PTEN 基因具有双特异性磷酸酶活性,在调控细胞周期和细胞的正常生长发育中扮演重要角色,近年来在促进肿瘤细胞凋亡方面逐渐引起了人们的重视。PTEN 基因可以通过不同的机制引发细胞凋亡[9]。

化疗作为肿瘤治疗的重要手段,至少在现阶段有不可替代的作用。目前的研究表明,化疗药物的抑癌作用至少部分是通过上调抑癌基因的表达来实现的。郑国宝等[10]用 Western blot 法,检测氟尿嘧啶(5-Fu)、丝裂霉素及顺铂作用于大肠癌细胞 HT-29 6 h 及 24 h 后 PTEN 蛋白表达情况。3 种药物作用 6 h 后,与对照组比较,PTEN 表达量均呈不同程度增高。作用 24 h 后,PTEN 表达量顺铂为对照组的 3.53 倍,5-Fu 为对照组的 1.68 倍,丝裂霉素为对照组的 2.21 倍。且用上述药物作用 6 h 后,大肠癌细胞的生长速度较对照组明显减慢。说明常用化疗药物可通过上调癌细胞中 PTEN 表达量来实现其抗癌作用。我们前期的研究表明,持续小剂量化疗可以使凋亡抑制因子 NF-κB 的表达明显降低,从而使凋亡增加[11,12]。Vasudevan 等[13]报道,PTEN 受 NF-κB 的 P65 亚基向下调节而减少表达。人肺癌和甲状腺癌细胞都有大量内源性 P65 产生,可以用特异性的 IκB 过表达来抑制 NF-κB 途径,从而使 PTEN 表达增加,这和 RNA 干扰直接抑制 P65 的表达效果是相同的。曲妥单抗作为 ErbB2 的靶向性抗体,对 ErbB2 高表达肿瘤有显著的效果。Nagata 等[14]报道,曲妥单抗治疗后可以使 PTEN 膜表达和磷酸酶活性迅速增加,从而促进其抗肿瘤作用。而 PTEN 缺乏的患者对曲妥单抗的反应明显弱于 PTEN 正常者。本研究采用腹腔给药的方式,持续小剂量(20 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)对荷瘤裸鼠给予化疗,观察到与大剂量组和对照组明显不同的效果。由表 1 我们可以看出,无论是 PTEN 蛋白的表达量,还是肿瘤细胞凋亡率,LDM 组与 MTD 组和对照组相比均有显著性差异($P<0.05$),而 MTD 组和对照组相比虽然也有显著性差异($P<0.05$),但是 LDM 组优于 MTD 组($P<0.05$)。说明传统化疗也能使 PTEN 表达上调,这和郑国宝等的报道一致,但是 LDM 组优于 MTD 组。探讨其机制,可能是持续小剂量给药,使 NF-κB 的表达受到持续抑制而减少,或者有 IκB 的表达增加,从而使 PTEN 表达明显增加。而 MTD 化疗的间歇期内,NF-κB 的表达也许会增加。本研究表明,化疗后肿瘤细胞凋亡增加,PTEN 表达上调是其可能机制之一。下一步我们将进一步扩大样本量,探讨持续小剂量化疗引起 PTEN 和凋亡表达增加的内在机制。

**参考文献:**

[1] Kerbel R S, Klement G, Pritchard K I, *et al*. Continuous low-dose anti-angiogenic/metronomic chemotherapy: from the research laboratory

into the oncology clinic[J]. Ann Oncol, 2002, 13(1): 12 - 15.
[2] Gately S, Kerbel R. Antiangiogenic scheduling of lower dose cancer chemotherapy[J]. Cancer J, 2001, 7(5): 427 - 436.
[3] Emmenegger U, Man S, Shaked Y, *et al*. A comparative analysis of low-dose metronomic cyclophosphamide reveals absent or low-grade toxicity on tissues highly sensitive to the toxic effects of maximum tolerated dose regimens[J]. Cancer Res, 2004, 64(11): 3994 - 4000.
[4] Bertolini F, Paul S, Mancuso P, *et al*. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells[J]. Cancer Res, 2003, 63( 5): 4342 - 4346.
[5] Browder T, Butterfield C E, Kraling B M, *et al*. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(7): 1878 - 1886.
[6] Mariani S M. Antiangiogenesis cocktails--stirred or shaken? [J]. Med Gen Med, 2004, 6(4): 21.
[7] Wu H, Goel V, Haluska F G. PTEN signaling pathways in melanoma [J]. Oncogene, 2003, 22(20): 3113 - 3122.
[8] 汲振余，李肖蕖，禹丽娜，等. 野生型抑癌基因 PTEN 真核表达载体的构建及鉴定[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(6)：1024 - 1028.
[9] 李祥勇，林观平，周克元. 抑癌基因 PTEN 与细胞凋亡关系的研究进展[J]. 广东医学院学报，2005，23(6)：676 - 678，686.
[10] 郑国宝，王元和，高春芳，等. 常用化疗药物对大肠癌细胞系 PTEN 蛋白表达的影响[J]. 实用癌症杂志，2004，19(1)：69 - 71.
[11] 陈忠华. 野生型 INK4α 基因转染对肺腺癌 A549 细胞放疗敏感性的调控[J]. 第三军医大学学报，2006，28(8)：785 - 787.
[12] 盛伟利，梅同华. 不同剂量环磷酸胺对裸鼠 A549 细胞移植瘤凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(4)：311 - 313.
[13] Vasudevan K M, Gurumurthy S, Rangnekar V M. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(3): 1007 - 1021.
[14] Nagata Y, Lan K H, Zhou X Y, *et al*. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients[J]. Cancer Cell, 2004, 6(2): 117 - 127.

（编辑　王小寒）

（上接 1759 页）

2.2　独生子女与非独生子女军医本科生心理承受力的比较

独生子女军医本科生心理承受力评分为(19.44 ± 4.89)，非独生子女心理承受力评分为(17.89 ± 4.86)，两组无显著性差异($P > 0.05$)。

## 3　讨论

大学生的心理健康问题一直是大学教育关注的热点，军校作为培养新时代高素质军队科技人才的摇篮，更应该重视和研究该课题。已有的研究表明心理压力、心理承受能力、应付挫折的能力和方式、个性特征等是影响大学生心理健康的重要因素[1-3]。心理承受力是指在遇到不顺心的事，遭受到较大压力和挫折时可以制止、避免行为失常的能力，也就是一个人可以经受住来自环境的各种压力和打击，从而更好地适应环境的能力。为此，我们对军医大学生心理承受能力及影响因素(应对方式、性格等)进行了调查，以期为提高军校大学生心理承受能力提供干预策略和依据。

我们的结果显示：大部分军医本科生有较强的心理承受能力，常采用成熟的心理防御机制；心理承受能力差者(心理承受能力评分<8 分)仅占 3.22%，说明军医本科生整体心理健康水平较高，心理承受能力较强，这可能与军校生源较好，学生整体素质较高以及军校对军人大学生训练管理要求严格，学生培养目标较高有关。本组军医本科生心理健康水平明显好于一般中专医学生(目前还未见医学本科生心理承受力现状的报道，史红荣等[4]报道的中专医学生心理承受能力差者为 9.15%)。2 军医本科生心理承受能力与性格和应付方式有关，情绪越稳定者心理承受能力越强，性格越外向者心理承受能力越强，即心理承受能力强者多为外向、情绪稳定者，他们在压力下多采用解决问题、求助的应付方式，较少采用自责、幻想、退避等消极的、不成熟的应付方式。本研究提示我们要对大学生进行情绪教育，提高大学生识别情绪、管理情绪、宣泄情绪的能力以增强他们情绪的稳定性。

因此，可以从以下几个主要方面培养大学生心理承受能力：1 培养合理的认知方式：认知理论认为，认知评估是压力反应的基本调节器，个体是否感到压力，压力程度如何与其认知方式有密切的关系。大学生之所以会有这么大的压力，很大原因在于他们不合理的认知。可以通过认知训练学习正确的认知和归因方式、培养其乐观、自信的生活态度等改善认知。2 培养良好的、积极的应对策略：应对是个体对压力进行评价后所采取的维护身心健康的措施。心理承受能力强者多采取“解决问题”、“求助”积极的健康的应对策略，而心理承受能力弱者多采取“逃避”等消极的应对策略，通过积极应对策略训练提高大学生处理问题的能力，增强其适应性。3 进行挫折教育：近年来对青少年进行挫折教育的呼声日益强烈而迫切。所谓挫折教育就是创设一定的挫折情境，以锻炼大学生的挫折耐受力，培养他们坚韧不拔的意志和毅力，促进他们形成坚韧的性格。

总之，加强心理承受能力培养，不仅是大学期间正常学业、生活的基本需要，也是促进大格完善和德、智、体全面发展的重要条件，更是军队培养高素质合格人才的根本保证。

关键词：军校；医学本科生；心理承受能力；人格；应付方式
中图法分类号：R395.6　　文献标识码：B

## 参考文献：

[1] 李　敏，贺上海. 455 名军医本科学生心理健康状况分析[J]. 第二军医大学学报，1999，21(6)：454 - 456.
[2] 吕同生，王希佳，马　荣，等. 心理卫生评定量表手册(增订版)[M]. 北京：中国心理卫生杂志社，1999：109 - 115.
[3] 谷　琴，朱士群. 焦虑症患者不相关刺激训练前后应付方式调查分析[J]. 实用临床医药杂志：护理版，2007，3(1)：114 - 115.
[4] 李彦章，李　敏，冯正直. 军医大学生应对方式与自我和谐的关系[J]. 中国临床康复，2004，8(6)：1144.
[5] 史红荣，崔书全. 中专医学生心理承受能力的探讨[J]. 中等医学教育，2001，19(增刊)：89.

（编辑　薛国文）