论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0758-03

硼替佐米对U87胶质瘤放射增敏及细胞周期分布的影响

樊锐太,胡 勇,刘俊启,张晶晶,陈昱丞,宋 锐,顾 浩 (450052 郑州,郑州大学第一附属医院放疗科)

[摘要] **目的** 探讨硼替佐米(bortezomib,BTZ)对放射治疗U87胶质瘤裸鼠移植瘤的增敏作用和细胞周期分布的影响。**方法** 建立裸鼠U87胶质瘤模型。造模成功的裸鼠随机分为4组:空白组(C)、照射组(RT)、硼替佐米组(BTZ)和联合组(BTZ+RT),裸鼠经8 MeV-β线照射治疗,联合组在照射基础上分别经腹腔注射BTZ,剥离瘤组织,称量计算抑瘤率,测定细胞周期分布、肿瘤生长延迟时间(TGD)、放射增敏比(SER),并比较各组裸鼠平均生存时间。**结果** BTZ+RT组抑瘤率为46.5%,优于RT组的31.5%($F=25.6$,$P<0.01$);BTZ+RT组生长延迟时间(TGD)长于RT组(59 d *vs* 38 d,$P<0.01$),BTZ+RT使单独放疗的敏感性提高1.44倍;RT联合应用BTZ后,G_0/G_1期细胞比例下降(79.9% *vs* 66.0%,$P<0.01$),G_2/M期细胞比例显著提高(3.2% *vs* 16.4%,$P<0.01$);BTZ联合RT对小鼠生存时间也有较大改善。**结论** BTZ对放射治疗U87胶质瘤具有明显的增敏效应,能够有效逆转放射所致细胞G_0/G_1期进程阻滞,提高G_2/M期细胞比例,延长带瘤小鼠生存时间。

[关键词] 恶性脑胶质瘤;硼替佐米;放射治疗;放射增敏

[中图法分类号] R730.23;R730.264;R730.55 [文献标志码] A

Effect of bortezomib on radiosensitivity of U87 glioma and distribution of cell cycle

Fan Ruitai, Hu Yong, Liu Junqi, Zhang Jingjing, Chen Yucheng, Song Rui, Gu Hao (Department of Radiotherapy, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of bortezomib (BTZ) on radiosensitivity of U87 glioma and distribution of cell cycle. **Methods** A nude mouse U87 glioma model was established. The nude mice were randomly divided into control group, irradiation group, BTZ group, and irradiation + BTZ group. After treatment with 8MeV-β irradiation, mice in irradiation + BTZ group were treated with BTZ by intraperitoneal injection. U87 glioma tissue was isolated and weighed. U87 glioma-inhibiting rate was calculated. Distribution of cell cycle, tumor growth delay (TGD) time, and sensitizing enhancement ratio (SER) were detected. The average survival time of nude mice in different groups was compared. **Results** The U87 glioma-inhibiting rate was significantly higher and the TGD time was significantly longer in irradiation + BTZ group than in irradiation group (46.5% *vs* 31.5%, 59 d *vs* 38 d, $P<0.01$). The sensitivity of radiotherapy was increased 1.44-fold when irradiation was combined with BTZ treatment. The proportion of tumor cells at the G_0/G_1 phase was significantly lower than that of those at the G_2/M phase after irradiation and BTZ treatment than before irradiation and BTZ treatment (79.9% *vs* 66.0%, 3.2% *vs* 16.4%, $P<0.05$). The survival time of nude mice was longer after irradiation and BTZ treatment. **Conclusion** BTZ can significantly up-regulate the radiosensitivity of U87 glioma, effectively reverse the irradiation-induced retardation of tumor cells at the G_0/G_1 phase, increase the proportion of tumor cells at the G_2/M phase, and prolong the survival time of tumor-bearing mice.

[**Key words**] malignant glioma; bortezomib; radiotherapy; radiosensitivity

Supported by the Tackling Project of Department of Science and Technology of Henan Province (0624410042). Corresponding author: Gu Hao, E-mail: 409898944@qq.com

泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway,UPP)是生物体内蛋白质选择性降解的重要途径,可影响基因表达调控、细胞周期、氧化应激反应等多种细胞活动[1]。蛋白酶体抑制剂特异性地抑制蛋白酶体活性,阻止肿瘤的生长、黏附及血管生成。蛋白酶体抑制剂也显示其对DNA损伤药物作用肿瘤细胞的增敏效应,包括对在不同肿瘤模型中的电离辐射的增敏

[基金项目] 河南省科技厅攻关项目(0624410042)

[通信作者] 顾 浩,E-mail:409898944@qq.com

效应[2],因此在人类癌症的治疗中引人关注。硼替佐米(商品名 bortezomib,BTZ,商品名万坷,Velcade)是高选择性的,可逆性的蛋白酶体抑制剂,目前临床上主要用于血液系统肿瘤的治疗,如骨髓瘤、多发套细胞淋巴瘤。近几年对某些实体肿瘤的应用也进入了临床前期试验,包括高级别脑胶质瘤[3]。本实验通过建立胶质瘤异种移植模型,研究 BTZ 对放射治疗的增敏及对细胞周期分布的影响,以期为进一步的临床实验、临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

硼替佐米(bortezomib,BTZ),美国 Ben Venue Laboratories Inc. 生产,进口药品注册证号 H20090822。SW-CJ-2FD 医用型净化工作台,苏州净化设备有限公司;流式细胞,FACScan Becton Dickinson;精密电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Siemens 直线加速器。

雌性清洁级 BALB/c 裸鼠 64 只,由郑州大学实验动物中心提供,合格证号:scxk(豫)2011-0003,4 ~ 6 周龄,体质量 18 ~ 22 g;U87 胶质瘤株,购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

1.2 方法

1.2.1 U87 胶质瘤裸鼠模型制作方法 U87 细胞用 10% 的新鲜胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 mg/ml DMEN 高糖培养基培养,在 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度条件下培养。后通过胰酶消化、吹打脱壁后,用无血清培养液离心洗涤 2 次后溶解至细胞计数 10^7/ml。取 1 ml 注射器,抽取瘤细胞悬液接种于裸鼠右前肢腋部皮下,0.2 ml/只。瘤细胞接种前,用台盼蓝染色,计算活细胞数为 95% ~98%。

1.2.2 BTZ 对放射治疗的增效作用的测定 于模型建立 12 d后,选取肿瘤直径长至约 6(5.8 ~6.2) mm 的 64 只裸鼠作为入组对象,分为实验 A 组和实验 B 组,每组 32 只,给 2 组动物进行随机数字编号,再次随机分为 4 组:空白组:腹腔注射生理盐水;硼替佐米组(BTZ):腹腔注射 BTZ 0.9 mg/kg(根据人与小鼠药物剂量换算公式计算所得)[4];照射组(RT):裸鼠用 1% 水合氯醛麻醉后将其固定在自制木板上,专用画线笔标记右前肢腋部肿瘤区域,表面覆盖 1 cm 的组织等效材料,使用 8MeV-β 线照射(2 Gy/min 照射 5 min),每周 1 次,连续照射 2 周;联合组(BTZ + RT):在经 8 MeV-β 线照射前 4 h 腹腔注射 BTZ 0.9 mg/kg,每周 1 次,连续 2 周,以上给药容积均为 20 ml/(kg · d)。实验 A 组于末次照射 24 h 后以颈椎脱臼法处死小鼠,完整剥去瘤组织,称取瘤质量,计算抑瘤率。实验 B 组裸鼠正常饲养直至死亡,每天用游标卡尺测量肿瘤的最长径(a)及最短径(b),肿瘤体积 $V = ab^2/2$。抑瘤率 = (1 - 治疗组平均瘤质量/空白组平均瘤质量) ×100%[5]。

1.2.3 BTZ 对放射治疗后细胞周期分布的影响 将实验 A 组移植瘤组织取出,剪刀剪碎,并用 0.1 mol/L PBS 液反复冲洗,用 200 目金属网过滤成单细胞悬液,离心后去掉上清液,再加入 0.1 mol/L PBS 液冲洗,再离心,去掉上清液,加入 70% 乙醇 1 ml,边加边振荡,4 ℃保存。染色前弃去 75% 乙醇,加生理盐水 5 ml 洗 2 次,300 目金属网过滤,滤液约 1 ml,加 PI(碘化丙啶)染色液 50 μl(500 μg/ml),RNase 1 μl(10 mg/ml),混匀,4 ℃避光放置 30 min,然后使用流式细胞仪,作细胞周期采样分析。

1.2.4 裸鼠生存时间的测定 实验 B 组裸鼠正常喂养,直至死亡,计算从接种肿瘤细胞开始,至动物死亡的时间。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,BTZ 对放射治疗增敏作用采用两因素析因设计资料的方差分析;肿瘤生长延迟、细胞周期分布的组间比较采用单因素方差分析;生存时间采用 Kaplan-Meier 分析。

2 结果

2.1 BTZ 对裸鼠一般状况的影响

本实验各组裸鼠给药后(临床推荐剂量),精神状态均较好,活动正常,进食进水正常、反应敏捷、皮肤颜色正常,大便未见异常。

2.2 BTZ 对放射治疗的增敏作用

瘤质量及抑瘤率结果见表 1,BTZ 组的主效应无统计学意义($F = 3.86$, $P > 0.05$);RT 组的主效应有统计学意义($F = 32.0$, $P < 0.01$),两者联合应用有很好的交互作用($F = 25.6$, $P < 0.01$)。说明 BTZ 对放射治疗具有增敏作用。

肿瘤生长延迟及放射增敏比的测定结果见表 2,BTZ 组未见明显肿瘤生长延迟,TGD 为 3 d。抗肿瘤效果在 BTZ + RT 组表现得最为明显:肿瘤体积扩增 3 倍时间达 70 d,生长延迟时间 TGD 为 59 d,放射增敏比为 1.44,即 BTZ + RT 使单独放疗的敏感性提高 1.44 倍。

表 1 BTZ 和电子线照射裸鼠的瘤质量和抑瘤率

组别	例数(始/末)	瘤质量(g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率(%)
空白组	8/8	2.00 ±0.31	–
BTZ 组	8/8	1.82 ±0.58	9.0
RT 组	8/8	1.37 ±0.38	31.5
BTZ + RT 组	8/8	1.07 ±0.18	46.5

表 2 肿瘤生长延迟及放射增敏比的测定

组别	例数(始/末)	瘤体扩增 3 倍时间 (d)	延迟时间 (d)	增敏比
空白组	8/8	11	–	–
BTZ 组	8/8	14	3	–
RT 组	8/8	49	38	–
BTZ + RT 组	8/8	70	59	1.44

肿瘤生长延迟时间:当肿瘤体积增至实验开始时体积的 3 倍,所需时间与空白组所需时间的差值。放射增敏比:为 BTZ + RT 组的肿瘤生长延迟时间与 RT 组和 BTZ 组的肿瘤生长延迟时间的和之比。

2.3 BTZ 对裸鼠生存时间的影响

结果显示,空白组裸鼠平均生存时间(14.4 ±0.9) d,BTZ

组(15.8±0.5)d,RT组(54.6±0.6)d,BTZ+RT组(75.3±2.1)d,各组间差异有统计学意义($F=43.12$,$P<0.05$)。BTZ组与空白组无统计学差异($P>0.05$);而BTZ+RT组与RT组有差异($P<0.05$)。

2.4 BTZ对放射治疗后细胞周期分布的影响

U87移植瘤接受放射治疗后与空白组比较,处于G_2/M期的细胞减少了3倍(3.2% *vs* 11.6%),在G_0/G_1期的细胞阶段略有增加(79.9% *vs* 74.5%)。表明U87移植瘤接受照射后引起肿瘤细胞G_0/G_1进程阻滞。联合应用BTZ后扭转了RT对肿瘤细胞周期分布的影响,使G_0/G_1期细胞比例下降到66.0%($P<0.01$),而G_2/M期细胞增加到16.4%($P<0.01$)。

3 讨论

通常抗肿瘤细胞药物多通过阻断蛋白质和DNA合成,干扰肿瘤细胞代谢和有丝分裂过程起作用[6]。然而蛋白酶体抑制剂则通过抑制蛋白酶体,阻断细胞蛋白的降解来抑制肿瘤细胞生长,促进肿瘤细胞凋亡。其作用途径如"泛素-蛋白酶体通路"理论荣获2004年诺贝尔化学奖。硼替佐米作为一种可逆性蛋白酶体抑制剂,可以选择性地与蛋白酶体活性位点的苏氨酸结合,抑制蛋白酶体26S亚单位的糜蛋白酶/胰蛋白酶活性。研究证实,在硼替佐米1.3 mg/m^{2}剂量下,细胞内60%~70%的蛋白酶体功能受抑制,通常在72 h内恢复。硼替佐米对肿瘤细胞蛋白酶体的抑制更为敏感,敏感性较正常细胞高100~1 000倍。蛋白酶体抑制剂与许多药物合用呈现出协同或增敏作用,而不是单纯的相加作用,如紫杉醇、5-FU、顺铂、阿霉素、伊立替康等。

脑胶质瘤是神经系统最常见的恶性疾病,占颅内肿瘤的35%~60%,目前标准治疗恶性胶质瘤(WHO 3级和4级)的模式是:术后放疗并同时行以替莫唑胺为基础的辅助化疗[7]。但是恶性胶质瘤的死亡率仍居高不下,其中位生存期仅52周。最新国内外研究称,传统的化疗药物和/或靶向药物与放疗合用需要重新组合,以改善患者的预后,但是这一目标的实现离不开合理用药的选择以及放射增敏机制的研究[8]。BTZ已被证实在体外对胶质瘤细胞具有高毒性[9-10],但是在国外的动物模型试验中尚不能证实单独应用BTZ具有抗肿瘤效果[11]。关于BTZ结合RT和或替莫唑胺对脑胶质瘤患者治疗效果观察的临床Ⅰ~Ⅱ期实验已在进行中,本实验通过建立U87胶质瘤裸鼠移植瘤模型,评价了BTZ结合RT对胶质瘤的抑制作用,结果显示,BTZ对放射治疗U87胶质瘤具有明显的增敏效应,与以前文献中所报道的结果相符合[12],且能明显提高裸鼠的生存时间。BTZ的放射治疗增敏机制可能与其干预照射后细胞周期的分布有关。U87移植瘤受照射后出现G_0/G_1期比例增高,G_2/M期细胞比例降低,而与BTZ联合应用后能明显逆转这种变化,这与Pajonk等[13]报道的关于蛋白酶体抑制剂MG132联合放射治疗对前列腺癌PC-3细胞周期分布的影响结果一致。

本实验研究结果证实,BTZ对放射治疗U87胶质瘤表现出良好的增敏效应,能有效提高带瘤裸鼠的存活时间,其放射增敏机制可能与其逆转放射所致细胞G_0/G_1期阻滞,提高G_2/M期细胞比例有关。

参考文献:

[1] 吴慧娟, 张志刚. 泛素-蛋白酶体途径及意义[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(1): 7-10.

[2] Wu W K, Cho C H, Lee C W, *et al*. Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment[J]. Cancer Lett, 2010, 293(1): 15-22.

[3] U. S. National Institutes of Health. Clinical Trials. gov[OL]. [2011-04-26]. http://clinicaltrials. gov.

[4] 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版, 2002: 203.

[5] Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, *et al*. Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes--current status and new strategies[J]. Hum Cell, 2003, 16(4): 183-189.

[6] 向莉, 李书剑, 张杰文. 美洲商陆抗病毒蛋白对人神经胶质瘤细胞U251细胞增殖和凋亡的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2011, 46(5): 742-744.

[7] Stupp R, Mason W P, van-den-Bent M J, *et al*. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma[J]. N Engl J Med, 2005, 352(10): 987-996.

[8] Stupp R, Hegi M E, Mason W P, *et al*. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(5): 459-466.

[9] Styczynski J, Olszewska-Slonina D, Kolodziej B, *et al*. Activity of bortezomib in glioblastoma[J]. Anticancer Res, 2006, 26(6B): 4499-4503.

[10] 范军强, 赵勇刚, 范波, 等. 蛋白酶体抑制剂MG-132对体外人U87胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2009, 27(3): 161-163.

[11] Labussiere M, Pinel S, Delfortrie S, *et al*. Proteasome inhibition by bortezomib does not translate into efficacy on two malignant glioma xenografts[J]. Oncol Rep, 2008, 20(5): 1283-1287.

[12] Stoll S J, Pitt S C, Chen H. Follicular thyroid cancer cell growth inhibition by proteosome inhibitor MG132[J]. J Surg Res, 2009, 156(1): 39-44.

[13] Pajonk F, van-Ophoven A, Weissenberger C, *et al*. The proteasome inhibitor MG-132 sensitizes PC-3 prostate cancer cells to ionizing radiation by a DNA-PK-independent mechanism[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 76.

(**收稿**:2011-10-27;**修回**:2011-12-19)

(编辑 汪勤俭)