[2] Young T, Palta M, Dempsey J, *et al*. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults[J]. N Engl J Med, 1993, 328(17): 1230-1235.
[3] Hasan A, Uzma N, Swamy T L, *et al*. Correlation of clinical profiles with obstructive sleep apnea and metabolic syndrome[J]. Sleep Breath, 2012, 16(1): 111-116.
[4] Pavlova M, Sheikh L S. Sleep in women[J]. Semin Neurol, 2011, 31(4): 397-403.
[5] Yaggi H K, Strohl K P. Adult obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome: definitions, risk factors, and pathogenesis[J]. Clin Chest Med, 2010, 31(2): 179-186.
[6] Lin Q C, Zhang X B, Chen G P, *et al*. Obstructive sleep apnea syndrome is associated with some components of metabolic syndrome in nonobese adults[J]. Sleep Breath, 2012, 16(2): 571-578.
[7] Tanner J M, Chang T I, Harada N D, *et al*. Prevalence of comorbid obstructive sleep apnea and metabolic syndrome: syndrome Z and maxillofacial surgery implications[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2012, 70(1): 179-187.
[8] Mirza M, Shen W K, Sofi A, *et al*. Frequent periodic leg movement during sleep is associated with left ventricular hypertrophy and adverse cardiovascular outcomes[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2013, 26(7): 783-790.
[9] Collen J, Lettieri C, Kelly W, *et al*. Clinical and polysomnographic predictors of short-term continuous positive airway pressure compliance[J]. Chest, 2009, 135(3): 704-709.
[10] Pedrosa R P, Drager L F, Gonzaga C C, *et al*. Obstructive sleep apnea: the most common secondary cause of hypertension associated with resistant hypertension[J]. Hypertension, 2011, 58(5): 811-817.
[11] Goodson B L, Wung S F, Archbold K H. Obstructive sleep apnea hypopnea syndrome and metabolic syndrome: a synergistic cardiovascular risk factor[J]. J Am Acad Nurse Pract, 2012, 24(12): 695-703.
[12] Cuhadaroglu C, Utkusavas A, Ozturk L, *et al*. Effects of nasal CPAP treatment on insulin resistance, lipid profile, and plasma leptin in sleep apnea[J]. Lung, 2009, 187(2): 75-81.
[13] Assoumou H G, Gaspoz J M, Sforza E, *et al*. Obstructive sleep apnea and the metabolic syndrome in an elderly healthy population: the SYNAPSE cohort[J]. Sleep Breath, 2012, 16(3): 895-902.

(**收稿**:2013-10-24;**修回**:2013-12-24)
(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2014)05-0513-03

短篇论著

健择对裸鼠未分化甲状腺癌的治疗作用

陈 磊[1],张青云[1],杨 植[1],高建国[1],郭风玲[1],刘彦春[1],陈序吾[2] (067000 河北 承德,承德医学院附属医院外二科[1];150001 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第一医院普外科[2])

[**摘要**] **目的** 通过建立甲状腺未分化癌裸鼠体内实验模型,检验健择对裸鼠甲状腺未分化癌的治疗作用。**方法** 选取3~4周龄雌性无胸腺清洁级裸鼠84只,体质量13~17 g,单细胞悬液裸鼠皮下注射的方法建立滤泡状癌(WRO)、乳头状癌(NPA)、未分化癌(ARO)3种甲状腺癌异体移植模型。待肿瘤体积达到50 mm^3后分为4组给予治疗:①健择组;②放疗组;③健择+放疗组;④盐水对照组。比较各组治疗前和治疗后肿瘤体积变化,观察健择组和健择+放疗组裸鼠组织器官的副损伤程度。**结果** 成功建立甲状腺癌异体移植模型。健择组3种甲状腺癌裸鼠治疗前后肿瘤体积差异显著[(85.40±20.01) *vs* (52.08±14.24) mm^3,(84.78±22.07) *vs* (51.96±14.35) mm^3,(121.22±40.34) *vs* (85.13±21.35) mm^3,$P<0.01$];放疗组3种甲状腺癌裸鼠治疗前后肿瘤体积无显著差异($P>0.05$);健择+放疗组3种甲状腺癌裸鼠治疗前后肿瘤体积差异显著[(92.22±25.98) *vs* (49.14±13.90) mm^3,(110.16±39.57) *vs* (58.93±15.21) mm^3,(124.72±37.37) *vs* (55.08±13.27) mm^3,$P<0.01$];健择组与健择+放疗组治疗前后肿瘤体积在未分化癌组有统计学意义($F=10.96$,$P<0.01$)。健择+放疗组裸鼠食管、肺脏出现纤维化,健择组未见纤维化出现。**结论** 单细胞悬液裸鼠皮下接种法可建立稳定的甲状腺癌动物模型;健择对裸鼠甲状腺未分化癌有治疗作用,辅以放射治疗可提高疗效但易导致脏器纤维化副损伤。

[**关键词**] 健择;甲状腺未分化癌;放射治疗;化疗;裸鼠
[**中图法分类号**] R736.1; R979.1 [**文献标志码**] A

甲状腺未分化癌是人类最具侵袭性的实体肿瘤之一,无论治疗与否平均生存时间为4~10个月[1-2]。由于甲状腺未分化癌生长快,发生局部和远隔转移早;同时此类癌细胞不浓聚碘,对化疗和放疗不敏感,因此常用的根治性手术结合放射治疗及化疗很难控制病情进展[3-4]。常用的化疗药物包括阿霉素和联合化疗方案[5],然而至今仍未见治愈的相关报道。健择通用名称盐酸吉西他滨(gemcitabine),化学名称2′-脱氧-2′,2′-盐酸二氟脱氧胞苷(β-异构体)[6]。健择是由美国FDA(Food and Drug Administration)推荐的氟化脱氧胞苷类似物。健择抗未分化甲状腺癌的体外实验已经证明其对甲状腺未分化癌的生长有抑制作用[7]。此外,

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(30672039)
[**通信作者**] 杨 植,E-mail:chenleichris@sohu.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131220.1115.020.html(2013-12-20)

健择具有放射诱导作用,可以提高肿瘤组织对放射线的敏感性[8]。本实验旨在探讨以健择作为化疗药物对甲状腺未分化癌进行化疗及联合放疗的疗效,为甲状腺未分化癌的综合治疗寻找有效手段,为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健择由美国 Eli Lilly 公司提供,人甲状腺癌细胞系(滤泡状癌癌株 WRO、乳头状癌癌株 NPA、未分化癌癌株 ARO)从 ACTT 公司购得。

1.2 实验动物

3~4 周龄、雌性无胸腺清洁级裸鼠共计 84 只,体质量 13~17 g,饲养环境 SPF 级,购于北京维通利华实验动物有限公司[合格证号:SCXK(京)2013-0013]。

1.3 方法

1.3.1 模型制作 甲状腺癌细胞在 10% 胎牛血清和 1% 非必需氨基酸的 RPMI1640 培养基中,细胞覆盖率 80% 时(对数生长期)收获。细胞在 PBS 缓冲液中制成 2×10^7/mL 的悬液,每只裸鼠背部皮下注射 0.2 mL 悬液[9-10]。2 周后隔日用游标卡尺测量肿瘤,用 $ab^2/2$ 计算肿瘤体积(a 为瘤体长径,b 为瘤体短径)[11]。皮下接种的癌细胞经过 4~7 周生长,瘤体生长到 50~250 mm^3 模型制作完成,进入治疗实验。

1.3.2 实验分组 ARO、WRO、NPA 各接种 28 只裸鼠建立甲状腺癌异体移植模型,模型建立后每种甲状腺癌使用 4 种不同治疗方法干预($n=7$)。具体方法如下:①健择组:按照间隔 3 d 共 4 次腹腔内注射治疗,健择每次 120 mg/kg;②放疗组:X 线放射治疗剂量 0.64~2 Gy/min,总放射线剂量为 8 Gy。放射源为美国瓦里安电子直线加速器(Varian-2100CD);③健择+放疗组:健择注射后 8~16 h 给予放射治疗,裸鼠置于铅盒内,背部肿瘤生长位置铅盒开洞(直径 1.0 cm);④盐水对照组:按照间隔 3 d 共 4 次腹腔内注射生理盐水,每次 3 mL。

1.3.3 病理学检查 健择组 13 d,健择加放疗组 14 d,最后一次治疗后 3 d 实验结束。结束后健择组和健择+放疗组裸鼠以 CO_2 吸入麻醉处死,切取食管、肺脏、肝脏、肾脏行石蜡包埋、HE 染色,观察健择和放疗对裸鼠组织器官的副损伤程度。

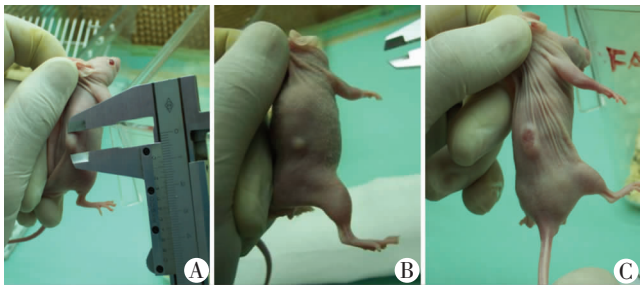
1.4 统计学方法

记录各组肿瘤体积用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件。4 组不同治疗方法组内治疗前和治疗后采用 t 检验,组间比较采用重复测量 F 检验。

2 结果

2.1 实验动物成瘤情况

各组裸鼠一般情况良好,体质量无明显变化,活动自如,精神状态佳。约 1 周可见裸鼠背部有实体肿瘤长出,模型建立时间:未分化癌(ARO)约 25 d,滤泡状癌(WRO)约 32 d,乳头状癌(NPA)约 40 d。实验动物成瘤大体标本见图 1。



A:滤泡状癌;B:乳头状癌;C 未分化癌

图 1 裸鼠滤泡状癌、乳头状癌和未分化癌背部成瘤大体观察

2.2 各组内肿瘤体积改变

结果见表 1。放疗组治疗后肿瘤体积较之治疗前无显著差异($P>0.05$);健择组治疗后肿瘤体积较治疗前明显缩小($P<0.01$);健择+放射组治疗后肿瘤体积较治疗前明显缩小($P<0.01$)。

表 1 NPA、WRO 和 ARO 各组内治疗前后肿瘤体积比较

(mm^3, $n=7$, $\bar{x}\pm s$)

甲状腺癌类型	健择组	放疗组	健择+放疗组	盐水对照组
NPA 治疗前	85.40±20.01	70.79±16.43	92.22±25.98	71.08±17.05
治疗后	52.08±14.24[a]	71.22±15.78	49.14±13.90[a]	75.97±18.23
WRO 治疗前	84.78±22.07	94.32±25.33	110.16±39.57	85.39±23.56
治疗后	51.96±14.35[a]	87.91±22.12	58.93±15.21[a]	128.40±39.06
ARO 治疗前	121.22±40.34	121.63±38.76	124.72±37.37	92.80±24.95
治疗后	85.13±21.35[a]	128.16±40.66	55.08±13.27 [a]	136.80±41.35

a:$P<0.01$,与治疗前比较

2.3 各组间肿瘤体积改变比较

健择组与健择+放疗组在乳头状癌(NPA)和滤泡状癌(WRO)中差异无统计学意义($P>0.05$);健择组与健择+放疗组在未分化癌(ARO)中差异有统计学意义($F=10.96$, $P<0.01$)。

2.4 HE 染色病理结果

裸鼠经放射+健择治疗后食管、肺脏均出现不同程度纤维化,而单独使用健择治疗后无此副损伤出现,见图 2。

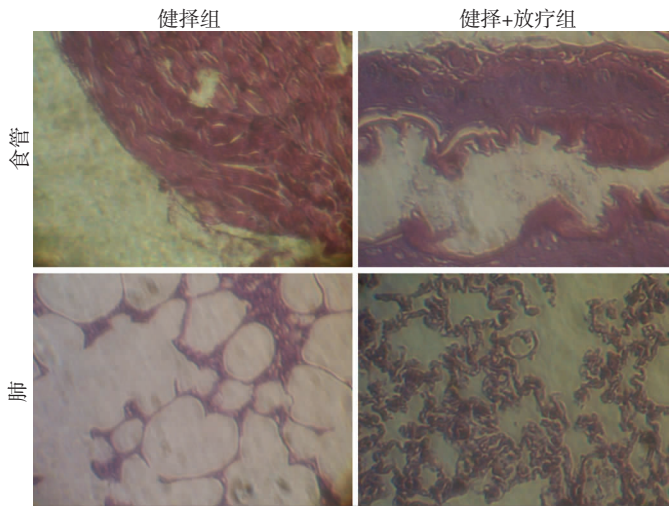


图 2 裸鼠经健择和健择+放疗治疗后脏器纤维化情况的比较 (HE ×40)

3 讨论

3.1 人甲状腺癌异体移植模型的建立

实验采用细胞悬液法建立人甲状腺癌裸鼠异体移植模型,即将癌株的单细胞悬液注射于裸鼠背部皮下,经过近 1 周时间可成瘤。此种方法需要重视以下几个问题:①接种于裸鼠的细胞数量。数量较少会使经自然死亡和机体消灭后存活下来的肿瘤细胞不足以成瘤;肿瘤细胞数量过多因细胞间竞争生存条件而导致坏死的数量增加,过多的坏死细胞必将影响存活瘤细胞的生存环境,使成瘤率下降。所以根据肿瘤的恶性程度选择适当的接种数量是十分重要的[12],我们选择在 0.2 mL 的 PBS 缓冲液中的细胞数量为 4×10^6 个,效果比较理想。②瘤细胞活力。首先要选择对数生长期细胞,当细胞覆盖培养瓶底近 80% 时收获,此时细胞具有最旺盛的分裂及生长能力;其次在收集细胞时使用消化液消化细胞的时间要把握好,一般来讲时间不要过长,否则会影响细胞的存活能力。并且在制备单细胞悬液最好选用加入 0.02% EDTA 的胰酶进行消化,这样更能保证单细胞悬液的质量;再者,从收集细胞制成单细胞悬液到细胞接种应在较短的时间(<40 min)内完成[13],由于 PBS 液不能提供细胞生存的营养物质,所以需尽量减少瘤细胞在缓冲液中的时间。

3.2 健择对裸鼠甲状腺癌的治疗作用

目前只有极少数药物对甲状腺癌有治疗作用,所以发现新的化疗药物是十分必要的。健择在体内通过核苷激酶的作用转化成具有活性的二磷酸及三磷酸核苷,其细胞毒作用就是由于二磷酸和三磷酸核苷抑制 DNA 合成。其作用具有细胞周期特异性,主要作用于 DNA 合成期,即 S 期细胞,在一定条件下可以阻止由 G_1 期向 S 期进展[14]。

我们共用了 3 种人甲状腺癌细胞,将其单细胞悬液接种于裸鼠后获得了稳定的甲状腺癌异体移植模型。从统计结果可以看出,健择在体内实验中可以起到抑制肿瘤生长的作用($P<0.05$)。单独使用放射治疗并没有疗效($P>0.05$)。健择合并放射治疗也可以抑制肿瘤生长($P<0.05$),健择与健择 + 放疗在 ARO 组的比较有统计学意义,说明健择 + 放疗在抑制甲状腺未分化癌生长时较单独使用健择更有效,这与 Kal 等[15]的实验有相似的结果。但是,健择与放疗的协同作用同时导致了脏器纤维化副损伤出现,送检的食管和肺脏病理标本显示健择合并放疗后裸鼠的脏器开始出现纤维化。鉴于未分化癌的高度恶性及难以治疗,可以考虑治疗时健择与放疗联合应用以增强健择对肿瘤的抑制作用,但需顾及二者联合使用时出现脏器纤维化的风险,以期提高疗效延长生存期的同时尽量降低脏器副损伤。

参考文献:

[1] Ain K B. Anaplastic thyroid carcinoma: behavior, biology, and therapeutic approaches[J]. Thyroid, 2008, 8(8): 715 - 726.

[2] Kebebew E, Greenspan F S, Clark O H, *et al*. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors[J]. Cancer, 2005, 103(7): 1330 - 1335.

[3] Besic N, Hocevar M, Zgajnar J. Lower incidence of anaplastic carcinoma after higher iodination of salt in Slovenia[J]. Thyroid, 2010, 20(6): 623 - 626.

[4] Higashiyama T, Ito Y, Hirokawa M, *et al*. Optimal Surgical procedure for locally curative surgery in patients with anaplastic thyroid carcinoma: importance of preoperative ultrasonography[J]. Endocr J, 2010, 57(9): 763 - 769.

[5] Higashiyama T, Ito Y, Hirokawa M, *et al*. Induction chemotherapy with weekly paclitaxel administration for anaplastic thyroid carcinoma [J]. Thyroid, 2010, 20(1): 7 - 14.

[6] 吴娜, 梁小丽. 健择[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(3): 204 - 205.

[7] Ringel M D, Greenberg M, Chen X, *et al*. Cytotoxic activity of 2′, 2′-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in poorly differentiated thyroid carcinoma cells[J]. Thyroid, 2000, 10(10): 865 - 869.

[8] Latz D, Fleckenstein K, Eble M *et al*. Radiosensitizing potential of gemcitabine (2′, 2′-difluoro-2′- deoxycytidine) within the cell cycle *in vitro*[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998, 41(4): 875 - 882.

[9] Hutzen B, Pierson C R, Russell S J, *et al*. Treatment of medulloblastoma using an oncolytic measles virus encoding the thyroidal sodium iodine symporter shows enhance efficacy with radioiodine[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 508.

[10] Teshima J, Doi H, Fujimori K, *et al*. A human thyroid cancer cell line, DH-14-3, newly established from poorly differentiated thyroid carcinoma[J]. Tohoku J Exp Med, 2013, 230(2): 75 - 82.

[11] 朱金水, 沈波, 陈金联, 等. NM-3 诱导裸鼠体内人胃癌细胞的凋亡机理[J]. 中国临床医学, 2005, 12(2): 221 - 223.

[12] Kawada K, Kitagawa K, Kamei S, *et al*. The feasibility study of docetaxel in patients with anaplastic thyroid cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2010, 40(6): 596 - 599.

[13] 徐梅, 吴强, 朱孝荣, 等. 卵巢癌细胞株荷皮下瘤裸鼠模型的建立[J]. 江苏医药, 2005, 31(9): 714.

[14] Voigt W, Bulankin A, Muller T, *et al*. Schedule-dependent antagonism of gemcitabine and cisplatin in human anaplastic thyroid cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2009, 6(5): 2087 - 2093.

[15] Kal H B, Sharouni S Y, Barten-van-Rijbroek A D. Gemcitabine as a radiosensitizer in undifferentiated tumors[J]. Anticancer Res, 2006, 26(1A): 139 - 145.

(**收稿**:2013-10-02;**修回**:2013-12-01)

(编辑 栾 嘉)