

·实验核医学·

 ^{125}I 粒子治疗对肝癌细胞凋亡及细胞周期的影响

张颖 林军

【摘要】 ^{125}I 粒子低剂量率连续照射肝癌细胞,能明显上调细胞 Bax 表达,降低 Bcl-2 表达,同时明显诱导细胞凋亡的发生,且细胞周期发生再分布,照射后细胞被阻滞在对辐射相对敏感的 G_2 M 和 S 期。研究表明, ^{125}I 粒子连续照射能够通过诱导凋亡的途径,明显杀伤肿瘤细胞。

【关键词】 肝肿瘤;碘放射性同位素;近距离放射疗法;细胞凋亡;细胞周期

Effects of ^{125}I seed brachytherapy on apoptosis and cell cycle distribution in hepatoma carcinoma cells

ZHANG Ying, LIN Jun

(Department of Nuclear Medicine, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

【Abstract】 Continuous irradiation of low dose rate ^{125}I seed resulted in an increase in the apoptosis and an increased expression of Bax and a decreased expression of Bcl-2. The cell-cycle arrest of hepatoma carcinoma cells was induced remarkably. The results demonstrated that low dose rate of continuous ^{125}I seed irradiation is effective on inducing the damage of the tumor cells.

【Key words】 Liver neoplasms; Iodine radioisotope; Brachytherapy; Apoptosis; Cell cycle

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一^[1],由于起病隐匿,发现时大多处于中晚期,手术切除的成功率低,因此,各种非手术治疗方法的单独或联合应用已成为目前治疗肝癌的重要手段。由于受正常肝脏组织对射线的耐受量限制,难以提升对肝癌的照射量,因此常规外放射治疗在肝癌的治疗应用中受到限制,从而导致肝癌外放射疗法疗效不佳。化疗对肝癌的疗效也较差^[2]。近年来,人们已逐步证实肝癌在放射生物学上属于辐射敏感性肿瘤,加之新型放疗技术和设备的不断推出,引起了越来越多学者对 ^{125}I 粒子植入近距离治疗肝癌的兴趣,然而其放射生物学方面的报道比较少。本文重点综述 ^{125}I 粒子近距离照射对肝癌细胞增殖和细胞周期影响的相关研究。

1 ^{125}I 粒子治疗肿瘤的作用方式

^{125}I 粒子半衰期为 59.6 d,发射的 γ 射线能量为 27~35 keV^[3],对铅的半价值厚度是 0.025 mm,在组织中有效半径为 17~20 mm,易于防护,与组

织间的相互作用主要为光电效应。 ^{125}I 粒子释放的低剂量 γ 射线可使 DNA 分子单链断裂、双链断裂;产生自由基,引起肿瘤损伤;所释放低剂量的 γ 射线又可使肿瘤细胞氧增比减少(即射线杀伤肿瘤细胞对氧的依赖性减少),进而部分克服了肿瘤乏氧细胞的放射抗拒性,乏氧细胞比例减少,不断消耗肿瘤干细胞而使肿瘤细胞死亡。

2 ^{125}I 粒子低剂量持续照射对肝癌细胞周期的影响

细胞增殖是以 G_0 期(休止期)- G_1 期(M 与 S 间期)-S 期(DNA 合成期)- G_2 期(S 与 M 间期)-M 期(有丝分裂期)循环往复的过程,不同的细胞时期对射线有不同的敏感性,DNA 合成期的辐射敏感性最差,DNA 合成后期 G_2 期和有丝分裂期 M 期细胞对射线的敏感性较高。放射生物学研究表明,肿瘤的恶性程度与细胞周期密切相关,电离辐射可以引起细胞周期进程的改变。然而,不同肿瘤细胞对电离辐射的敏感程度不同,因此细胞周期的阻滞时相和阻滞程度也不同。汤屹等^[4]对白血病 HL260 细胞株和 K562 细胞株、宫颈癌 SiHA 细胞株、子宫内膜癌 113 细胞株等四种肿瘤细胞给予 6~15 Gy 的 ^{60}Co 源照射,发现除子宫内膜癌 113 细胞表现 G_1

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2009.04.001

基金项目:福建省教育厅资助项目(JB:06255)

作者单位:350005 福州,福建医科大学附属第一医院核医学科

通信作者:林军(E-mail:linjun480311@163.com)

期阻滞外,其他三种细胞在受到照射后,均表现G₂/M期阻滞。也有研究认为有些肿瘤细胞在接受照射后不引起细胞周期阻滞,张占春等^[5]研究发现,用75 mGy低剂量X射线照射离体培养的A549细胞(一种肺癌细胞)后,细胞周期未发生变化。

研究表明,不管是高剂量率还是低剂量率照射,射线对细胞的作用时间均非常短暂,并且在照射结束后,随着时间的延长,肿瘤细胞的细胞周期发生再分布而使特定周期的阻滞现象解除。¹²⁵I粒子植入近距离照射治疗是一种低剂量率的持续照射,放射源对细胞的照射作用没有间断。邵文博等^[6]研究发现,¹²⁵I粒子近距离低剂量率持续照射可改变BEL-7402细胞(一种肝癌细胞)的细胞周期分布,使其阻滞于G₂/M期,并且射线对细胞周期的阻滞作用在粒子持续照射期间持续存在。细胞周期被阻滞于G₂/M期后,细胞周期将延长,照射剂量在G₂期积累,导致每个细胞周期的总剂量将增加。细胞周期中G₂/M期细胞对射线敏感性最高,¹²⁵I粒子低剂量持续照射细胞将细胞周期阻滞于G₂/M期,使细胞对射线的敏感性增加^[7],从而提高了¹²⁵I粒子对肿瘤细胞的杀伤性。

细胞经过G₀/G₁期、S期和G₂/M期3个检查点来控制细胞周期进程。当正常细胞的DNA受到射线及化疗药的损伤后,细胞将通过启动细胞周期检查点的信号转导通路,使细胞停滞于G₁期、S期、G₂/M期各个细胞周期检查点,进行损伤后修复^[8]。细胞DNA受损后有3种转归:①经损伤后修复,重新进入正常的细胞周期;②DNA损伤过于严重,细胞无法予以修复,从而走向凋亡;③细胞携带受损而无法修复的DNA重新进入细胞周期,这一类型的细胞很容易造成癌变。细胞的DNA损伤后,将启动一个快速的磷酸化级联反应,通过突变型共济失调性毛细血管扩张基因或血管紧张素II受体的转导,将损伤信号传至检查点蛋白激酶1或检查点蛋白激酶2,后者调控周期素-周期素依赖性激酶复合物,进而引起细胞周期阻滞^[9]。辐射诱导的限G₁期、G₂/M期阻滞被认为是机体对外界刺激的一种保护性反应,可以提供充足的时间来促使受损的DNA得以修复和排除辐射产生的自由基,以保证遗传的稳定性。

细胞周期阻滞与放射抗拒有关^[9]。细胞周期阻滞是为了延长时间,以保证受损伤的DNA有足够

的时间进行修复^[10],保证DNA的完整性,从而保持细胞的完整性存活。DNA损伤修复缺陷者辐射敏感性增高,细胞容易发生凋亡;相反则对放射抗拒。照射后G₁和S检查点功能受到干扰,从而诱发G₁阻滞,而G₂/M延迟与辐射敏感性有关,细胞中未修复的DNA损伤越多以及G₂/M阻滞时相越短,细胞辐射敏感性越高^[11]。

3 ¹²⁵I粒子低剂量持续照射肝癌细胞诱导细胞凋亡

细胞凋亡是细胞在一定生理或病理条件下,遵循一定的程序,最终激活内源性内切酶,自我结束生命的“自杀”性死亡,是细胞依赖酶能量、新基因表达和合成的一个主动过程,在肿瘤的发生发展中起重要作用。凋亡是肿瘤细胞死亡的主要机制之一,诱导凋亡是治疗肿瘤的重要方式。凋亡往往伴随细胞周期阻滞而来,大多数抗癌药物和基因免疫治疗以肿瘤细胞核酸为靶点,通过控制或阻断细胞周期的动态过程起作用,具有很强的周期时相性。射线诱导的细胞凋亡是放射治疗的主要机制之一,与肿瘤组织细胞辐射敏感性或放射抗拒性有关^[12]。射线通过直接作用于细胞DNA,使DNA分子单链或双链断裂,引起DNA复制、转录等过程受阻而致细胞死亡;或是射线被生物物质所吸收时电离辐射将水分子的轨道电子击出,自由电子再与水分子相互作用产生自由基,自由基的性质活泼,也可以对DNA造成损伤。¹²⁵I粒子照射时,细胞周期进行到G₂/M期容易形成阻滞。然而放射性粒子是连续不断的照射,G₂/M期阻滞也就增加了G₂/M期的总照射剂量,并且肿瘤细胞G₂/M期辐射敏感性最高,故而有助于提高射线对肿瘤细胞的杀伤效果,提高凋亡指数。

邵文博等^[6]研究发现,¹²⁵I粒子近距离低剂量率持续照射可改变肝癌BEL-7402细胞的周期分布,细胞阻滞于G₂/M期,诱导肝癌BEL-7402细胞的凋亡,并且对细胞周期的阻滞作用和对细胞凋亡的诱导作用在粒子照射期间持续存在。赵泉等^[13]应用免疫组织化学原位末端标记法检测肝癌小鼠移植瘤内¹²⁵I粒子植入近距离照射后肿瘤组织的凋亡情况,发现治疗组的凋亡指数比对照组增高。

4 凋亡相关的Bcl-2和Bax基因和蛋白的改变

传统观点认为辐射诱导DNA双链断裂是辐射

诱发细胞凋亡的最重要的原因,而另一种观点则认为辐射可诱导多种细胞一系列基因表达或使另一些基因表达下调和关闭,并通过细胞膜信号——靶系统激活,使细胞发生凋亡,信号转导是基因水平上的调控转录过程,涉及许多基因的参与。现在已知的细胞内与凋亡有关的基因可分为两大类:凋亡抑制基因(如 Bcl-2 基因等)和凋亡促进基因(如 Bax 基因等)。

Bcl-2 基因为凋亡抑制基因,是迄今研究得最深入和广泛的凋亡调控基因之一。Bcl-2 蛋白的高表达能抑制多种因素诱导的细胞凋亡,提示 Bcl-2 可能参与凋亡信号途径的最后步骤的调节。

Bax 蛋白的生理功能是促进细胞凋亡,其作用机制并不是自身直接起作用,一方面它的过表达启动凋亡的信号;另一方面表现在对 Bcl-2 蛋白抑制作用,这是 Bax 调节凋亡的主要机制。Bcl-2 和 Bax 蛋白表达之间的平衡是调节细胞凋亡的主要机制之一,其通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡: Bcl-2-Bax 异源二聚体抑制凋亡,而 Bax-Bax 同源二聚体促进凋亡^[14]。Bcl-2 和 Bax 的比例决定细胞的凋亡状态: Bcl-2 表达水平高于 Bax 时, Bcl-2 和 Bcl-2 形成同源二聚体,细胞凋亡受抑制; Bax 表达水平高于 Bcl-2 时,则形成 Bax-Bax 同源二聚体,细胞凋亡增强^[15]。

国内外许多学者研究发现,近距离放疗可降低 Bcl-2 基因水平,从而缩短肿瘤细胞寿命,加速细胞凋亡。邵文博等^[16]将 12 只荷人肝癌 BEL-7402 裸鼠模型分成治疗组和对照组各 6 只,治疗组每只裸鼠移植瘤内植入 1 枚活度为 33.3 MBq 的 ¹²⁵I 粒子,对照组则不进行干预,3 周后免疫组织化学显示治疗组 Bcl-2 基因低于对照组,而治疗组较对照组 Bax 基因明显升高。

5 结语

¹²⁵I 粒子种植治疗是肿瘤近距离放疗的一种新方法,在肿瘤治疗中取得了非常理想的局部控制率,引起了国内外许多学者的关注。与其他各种放射性粒子近距离照射一样,其进展需临床和基础许多领域的研究和合作。¹²⁵I 粒子照射肝癌细胞可使细胞周期发生再分布,细胞阻滞于对射线相对敏感的 G₂ 和 S 期,有可能导致细胞的自我增敏,从而提高 ¹²⁵I 粒子低剂量率、连续照射方式对肝癌细胞

的杀伤力。¹²⁵I 粒子照射肝癌细胞后,在基因和蛋白表达水平检测发现, Bcl-2 的表达降低、Bax 的表达增加, Bcl-2/Bax 比值显著降低,预示了肝癌细胞的凋亡趋势。以上研究结果证明, ¹²⁵I 粒子低剂量率、连续照射方式在体外对肝癌细胞株具有明显的杀伤力,为临床开展 ¹²⁵I 粒子永久性植入肿瘤提供了基础实验依据。

参 考 文 献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002, CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Nowak AK, Chow PK, Findlay M. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review. Eur J Cancer, 2004, 40(10): 1474-1484.
- [3] Pommier P, Delannes M, LeFloch O, et al. The French preliminary experience of the use of a seed-projector for exclusive iodine-125 prostate brachytherapy: feasibility and acute toxicity. Cancer Radiother, 2006, 10(8): 559-564.
- [4] 汤屹,刘文勋,周剑锋,等. ⁶⁰Co γ 射线照射后肿瘤细胞株的细胞周期阻滞变化. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23(6): 418-421.
- [5] 张占春,贾廷珍,朱应葆. 低剂量照射对细胞周期和修复基因表达的影响. 实用肿瘤学杂志, 2005, 19(2): 81-84.
- [6] 邵文博,宋金龙. ¹²⁵I 粒子近距离照射对 BEL-7402 肝癌细胞增殖和细胞周期的影响. 中国医学物理学杂志, 2005, 22(4): 567.
- [7] Nakamura H, Yasui Y, Saito N, et al. DNA repair defect in AT cells and their hypersensitivity to low-dose-rate radiation. Radiat Res, 2006, 165(3): 277-282.
- [8] Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature, 2000, 408(6811): 433-439.
- [9] 代金明,林汝仙,王升启. 细胞周期调控与细胞抗辐射能力. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, 23(5): 262-265.
- [10] Wang Y, Ji P, Liu J, et al. Centrosome-associated regulators of the G₂/M checkpoint as targets for cancer therapy. Mol Cancer, 2009, 8: 8.
- [11] Bull EE, Dote H, Brady KJ, et al. Enhanced tumor cell radiosensitivity and abrogation of G₂ and S phase arrest by the Hsp 90 inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin. Clin Cancer Res, 2004, 10(23): 8077-8084.
- [12] 梁克. 放射治疗与细胞凋亡//沈瑜,糜福顺. 肿瘤放射生物学. 北京:中国医药科技出版社, 2001: 420-425.
- [13] 赵泉,罗开元,时德. ¹²⁵I 粒子肝肿瘤组织间质植入治疗诱导凋亡的研究. 中华实验外科杂志, 2005, 22(1): 112.
- [14] Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, et al. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). J Nutr, 2006, 136(11): 2715-2721.
- [15] Cory S, Adams JM. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch. Cancer Cell, 2005, 8(1): 5-6.
- [16] 邵文博,韩建奎,宋金龙,等. ¹²⁵I 粒子植入治疗荷人肝癌裸鼠移植瘤的实验研究. 中华核医学杂志, 2006, 26(1): 23-25.

(收稿日期: 2009-04-16)