^{32}P -玻璃微球瘤内注射抗肿瘤作用及对外周血白细胞的影响

陈金凤, 王振兴, 曾雅静(广东省东莞市中心血站 523930)

【摘要】 目的 观察 ^{32}P -玻璃微球(^{32}P -GMS)的抑瘤效果及对外周血白细胞的影响。方法 称重法检测 ^{32}P -GMS 对小鼠 S180 肉瘤的抑瘤率及对外周血白细胞计数和淋巴细胞分类的影响。结果 ^{32}P -GMS 瘤内注射的抑瘤率分别为 15.2%、20.4%、32.5%; 治疗组小鼠随 ^{32}P -GMS 剂量的增大, 白细胞呈明显的上升趋势; 各治疗组淋巴细胞分类百分率高于对照组, 剂量超过 0.74 MBq/mL 有开始下降的趋势。结论 ^{32}P -GMS 瘤内注射有很强的抗肿瘤作用, 但对外周血白细胞计数和淋巴细胞分类有明显影响。

【关键词】 ^{32}P -玻璃微球; 肿瘤; 白细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.15.006 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)15-1932-02

Anti-tumor effect of ^{32}P glass microspheres intratumoral injection and its impact on peripheral blood leukocytes

CHEN Jin-feng, WANG Zhen-xing, ZENG Ya-jing (Dongguan Blood Center, Dongguan, Guangdong 523930, China)

【Abstract】 **Objective** To observe anti-tumor function and effects on white blood cell counting of ^{32}P glass microsphere (^{32}P -GMS). **Methods** Inhibitory rate of ^{32}P -GMS on S180 sarcoma was calculated by using weighting method, and the effects on white blood cell counting and lymphocyte classification were also analyzed. **Results** Inhibitory rates of intra-tumor injected ^{32}P -GMS with different dose of 0.74, 3.7 and 18.5 MBq/mL on S180 sarcoma were 15.1%, 20.3% and 32.4%, respectively. White blood cell counts could be increased with the increasing of the dose of ^{32}P -GMS. Lymphocyte percentage in treatment group was higher than model group. **Conclusion** ^{32}P -GMS could have effective anti-tumor function, but also could effect the white blood cell level and lymphocyte classification.

【Key words】 ^{32}P glass microsphere; tumor; white blood cell; effect

上世纪 80 年代中期, 有研究将 ^{32}P 做成玻璃微球用于治疗肿瘤, 其主要特点是可在肿瘤局部形成点状内照射放射源, 所载高能量核素不泄漏进入血液, 具有瘤内血管局部栓塞致肿瘤缺血缺氧坏死的作用, 应用前景十分广阔。本研究采用小鼠肿瘤模型实验, 探讨 ^{32}P -玻璃微球(^{32}P -GMS)抑制肿瘤的效果及其对外周血细胞计数的影响, 间接反映该治疗方法对机体免疫系统、骨髓组织的影响, 从而为放射性同位素肿瘤内注射治疗肿瘤提供实验数据。

1 材料与与方法

1.1 ^{32}P -GMS 由成都中核高通同位素股份有限公司提供。为灰褐色微球, 粒径 46~76 μm , 密度为 2.0~2.5 g/cm^3 。 ^{32}P 溶出度 30 d 之内小于 0.1%。放射纯 β 射线, 放射性核纯度为 99%, 其中 γ 射线含量小于 2%。放射性比活度为 550~3 700 MBq/g (15~100 mCi/g)。 ^{32}P 放射性半衰期为 14.28 d, 平均能量为 0.69 MeV (最大能量 1.71 MeV)。在实体瘤组织内的最大穿透距离为 8.0 mm, 平均距离为 3.2 mm。使用前须将 ^{32}P -GMS 与超液化碘油 (约 100 mg/mL) 充分振荡混匀, 制备成混悬液后使用。

1.2 实验小鼠及瘤株

1.2.1 清洁级实验小鼠 周龄 6~8 周, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 雌雄各半, 由广东医学院实验动物中心提供。

1.2.2 小鼠 S180 肉瘤细胞 广东医学院天然药物实验中心传代保存并提供。

1.3 主要仪器 净化工作台 (SW-CJ-1D 型) 由苏州净化设备厂提供, 电子天平 (AEG-220) 由日本 SHIMADZU 公司提供, 全自动血细胞计数仪 (BC-3000PLUS) 由深圳迈瑞公司提供, 电热鼓风干燥箱 (CS-101-2AB) 由重庆银河试验仪器有限公司

提供。

1.4 方法

1.4.1 实验分组 采用随机区组法将实验小鼠随机分为对照组、肿瘤模型组和低、中、高 3 个不同剂量 ^{32}P -GMS 实验组, 每组 8 只。对照组小鼠每只在腹腔内注射 0.5 mL 生理盐水, 肿瘤模型组小鼠每只在实体瘤中心注射 0.5 mL 生理盐水, 低、中、高剂量 ^{32}P -GMS 实验组分别在实体瘤中心注射终浓度为 0.74、3.7、18.5 MBq/mL 的 ^{32}P -GMS 混悬液各 0.5 mL。

1.4.2 肿瘤模型的建立 将传代保存的 S180 肉瘤细胞无菌接种于小鼠腹腔; 7 d 后, 选择生长良好的小鼠, 采用颈椎脱臼法处死小鼠。然后将小鼠置于 75% 的酒精中浸泡消毒 5 min, 取出小鼠置操作台上, 用医用镊子牵拉起小鼠腹壁皮肤, 用 5 mL 医用注射器穿刺入小鼠腹腔空腔内, 缓慢采集腹水, 注射器内可见乳白色浓稠腹水, 然后用无菌生理盐水按照 1:4 的比例稀释腹水, 取少量稀释后的腹水于离心管中, 加入锥虫蓝染色, 染色后用计数盘在显微镜下计数活细胞数, 活细胞数大于 98% 方可使用。如果达到使用要求应尽快在超净工作台接种于实验小鼠右腋窝皮下, 接种量 0.2 mL/只, 于 30 min 内完成。然后每天观察记录小鼠的活动情况, 第 7 天取眼球静脉血后, 脱臼处死, 完整剥取肿瘤组织。

1.4.3 外周血白细胞分类计数 各实验组小鼠第 7 天取眼球静脉血, 取血量 0.5 mL/只, 用白细胞稀释液稀释计数, 并做血涂片, 瑞姬氏染色, 计算淋巴细胞占白细胞的百分率。

1.4.4 肿瘤抑制率 不同剂量 ^{32}P -GMS 组小鼠给药后第 7 天称重, 处死后完整剥离肿瘤组织并称重, 计算抑瘤率。抑瘤率 = (对照组瘤重 - 不同剂量 ^{32}P -GMS 组瘤重) / 对照组瘤重 $\times$ 100%。

1.5 统计学处理 采用 SAS8.0 统计学软件, 计量资料采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠活动情况 每天观察记录各实验组小鼠的基本状况, 与对照组比较, 肿瘤模型组及不同剂量组小鼠的活动明显减少, 行动迟缓, 精神差, 被毛疏松, 无光泽, 呼吸困难, 饮食饮水减少。肿瘤内注射 ^{32}P -GMS 后的各组小鼠体质量增加相对缓慢, 饮食饮水略有增加, 整体情况略有好转。

2.2 抑瘤作用 ^{32}P -GMS 能明显抑制小鼠 S180 肉瘤的生长, 高剂量实验组抑瘤率达 32.4%, 不同剂量 ^{32}P -GMS 实验组与肿瘤模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。肿瘤模型组瘤块明显增大, 界限不清, 质地较软, 剥离困难, 有的肿瘤浸润至胸骨、锁骨及腋窝后侧等处。不同剂量 ^{32}P -GMS 实验组瘤体相对缩小, 肿瘤界限清晰, 质地较硬, 容易剥离, 不同剂量 ^{32}P -GMS 实验组的平均抑瘤率分别为 15.2%、20.4%、32.5%, 抑瘤率与剂量呈正相关。不同剂量 ^{32}P -GMS 实验组抑瘤率均高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见表 1。

表 1 ^{32}P -GMS 对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	剂量 (MBq/mL)	肿瘤组织重量 (g)	抑瘤率 (%)
对照组	0.0	0.0	0.0
模型组	0.0	1.22 ± 0.22	0.0
低剂量实验组	0.74	1.04 ± 0.25 ^a	15.2 ± 1.3 ^a
中剂量实验组	3.7	0.99 ± 0.11 ^b	20.4 ± 2.1 ^b
高剂量实验组	18.5	0.84 ± 0.17 ^b	32.5 ± 2.7 ^b

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

2.3 治疗前后小鼠体质量变化 体质量变化反映了小鼠整体功能状态。由表 2 可以看出, ^{32}P -GMS 作用后所有小鼠体质量均有不同程度的增加。对照组小鼠体质量增加明显, 模型组小鼠体质量增加缓慢, 模型组及不同剂量 ^{32}P -GMS 实验组小鼠体质量明显低于对照组 ($P < 0.01$), 低、中、高剂量组小鼠体质量明显高于模型组 ($P < 0.01$)。

表 2 ^{32}P -GMS 对 S180 肉瘤小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	剂量 (MBq/mL)	体质量(g)		
		试验前	试验后	增加体质量(g)
对照组	0.0	23.14 ± 0.26	33.16 ± 0.77	10.12 ± 0.32
模型组	0.0	22.99 ± 0.43	30.60 ± 0.17	7.67 ± 0.24 ^a
低剂量实验组	0.74	22.57 ± 0.49	31.56 ± 0.72	8.29 ± 0.33 ^{ab}
中剂量实验组	3.7	22.97 ± 0.62	31.24 ± 0.45	8.27 ± 0.42 ^{ab}
高剂量实验组	18.5	22.24 ± 0.59	31.55 ± 1.13	9.41 ± 0.58 ^{ab}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$ 。

表 3 ^{32}P -GMS 治疗对肿瘤小鼠白细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	剂量 (MBq/mL)	白细胞 ($\times 10^9/L$)	淋巴细胞 (%)
对照组	0.0	6.78 ± 0.256	26.75 ± 2.43
模型组	0.0	5.82 ± 0.161 ^a	30.87 ± 2.37 ^a
低剂量实验组	0.74	7.80 ± 0.153 ^c	45.00 ± 2.46 ^{ab}
中剂量实验组	3.7	8.77 ± 0.126 ^{ab}	38.71 ± 1.99 ^b
高剂量实验组	18.5	11.65 ± 0.520 ^{ab}	18.42 ± 1.62 ^{ab}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$ 。

2.4 ^{32}P -GMS 对肿瘤小鼠外周血白细胞的影响 白细胞水平能及时地反映机体对辐射的早期应急反应。由表 3 可见, 随注射剂量的增加, 白细胞呈明显的上升趋势。模型组及中、高剂量组小鼠白细胞数明显高于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 不

同剂量组小鼠白细胞数明显高于模型组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); ^{32}P -GMS 照射后, 模型组及低、中剂量组淋巴细胞百分率明显高于对照组, 高剂量试验组肿瘤小鼠淋巴细胞百分率明显低于对照组和模型组 ($P < 0.01$); 低剂量组肿瘤小鼠淋巴细胞百分率明显高于模型组 ($P < 0.01$)。

3 讨 论

放射性核素内照射是肿瘤放射治疗的一种重要途径, 尤其对手术不能切除的恶性肿瘤, 放射性核素内照射治疗临床效果非常明显, 正在成为肿瘤治疗的另一重要发展方向。Nakhgenvany 等^[1]报道总结了肿瘤内照射治疗药物应具备的特点: (1) β 射线, 能量高, 纯度高, 不含 γ 射线; (2) 药物局部点状分布, 不被正常组织吸收, 放射活性局限在肿瘤局部, 无其他不良反应; (3) 半衰期适合, 能量多能在短期内释放, 小剂量可将各类肿瘤细胞杀死, 且易于辐射防护。 ^{32}P -GMS 具备以上特点, 所以是一种理想的肿瘤内照射放射性核素材料。 ^{32}P -GMS 具有内照射和栓塞双重功能, 在肝癌、胰腺癌、脑胶质瘤的动物实验和临床应用中均有报道^[2-5], 应用 ^{32}P -GMS 治疗后, 均发现其能使肿瘤体积缩小, 且无其他不良反应。本次实验结果显示各剂量组小鼠瘤内注射 ^{32}P -GMS 治疗 7 d 后, 瘤体明显缩小, 抑瘤率与照射剂量呈正效应机制, 且肿瘤向周围组织浸融明显减少, 说明 ^{32}P -GMS 有很强的抗肿瘤作用。射线抗肿瘤的机制主要包括直接导致肿瘤细胞生物大分子成分破坏; 其次是产生高毒氧化的各种自由基和过氧化物, 这些物质可导致肿瘤细胞死亡^[6]; 第三是受照射细胞释放的一些活性物质或信号分子诱导未受照射细胞凋亡^[7], 或通过细胞间通讯连接介导这一过程^[8]。国内实验结果提示, 内照射可促进或加速肿瘤细胞凋亡, 且随着剂量的增加, 凋亡指数增高^[9], 本次研究结果与此一致。

^{32}P 的有效射程可以达到正常组织, 对正常组织能够产生辐射效应, 最为直接的是对血细胞的影响。从实验结果来看, 白细胞计数明显上升, 是急性辐射损伤的特征; 淋巴细胞分类百分率也有明显的变化, ^{32}P -GMS 低剂量组有淋巴细胞增加的趋势, 类似于低辐射免疫功能增强的理论; 而高剂量组则有明显的淋巴细胞百分率下降, 可能是低剂量照射出现即时增殖反应, 高剂量辐射产生了辐射免疫功能抑制。是否在一定低剂量范围内或短时间的辐射能够增强免疫功能, 有待进一步研究。在本实验的低剂量和高剂量 ^{32}P -GMS 组之间有淋巴细胞的辐射损伤最大临界值, 超过此值淋巴细胞发生增殖抑制。外周血淋巴细胞主要为 T 淋巴细胞, 其功能减弱将导致白细胞介素-2、干扰素- γ 等细胞因子生成降低, 自然杀伤细胞、细胞毒 T 淋巴细胞、肿瘤浸润淋巴细胞的杀伤能力下降, 最终导致机体抗癌功能下降。其机制是肿瘤细胞受到电离辐射后, FasL 表达增强, 激活的细胞毒 T 淋巴细胞也表达 FasL, 可通过 Fas 分子启动致死性信号转导, 使表达 Fas 的细胞凋亡^[10]。

放射治疗是一个较为庞大的系统工程, 涉及患者、设备、射线特征及与机体相互作用产生的生物效应, 而这种生物效应的管理很重要^[11]。放射性核素内照射治疗在保证对实体瘤治疗有效的前提下, 更重要的是保证治疗对象产生正向的生物效应, 避免负向生物效应的危害, 及内照射核素不泄漏到机体其他部位, 避免对机体产生辐射损伤或影响机体免疫系统的功能; 其次, 玻璃微球不能代谢, 当肿瘤组织经治疗痊愈后, 残留的玻璃微球仍具有放射性, 对周围正常组织仍有辐射损伤, 且已成为机体的异物, 对机体的正常生理功能必将产生影响。可见, 肿瘤内照射治疗需要利用其局部照射的 (下转第 1935 页)

CD147 广泛表达于人体多种组织,参与机体多种生理和病理过程。CD147 在多种肿瘤组织中高表达,通过诱导成纤维细胞分泌 MMP,可促使肿瘤细胞侵袭、转移、锚着非依赖性生长^[9-11]。在 AS 斑块及纤维帽中,CD147、MMP 亦有高表达,推测在 AS 形成过程中,CD147 可能通过诱导活化 MMP 促进动脉内膜斑块形成,甚至引起斑块表面的纤维帽破裂,粥样物自裂口逸入血流,导致溃疡或栓塞。有研究发现氧化型低密度脂蛋白刺激培养人冠状动脉平滑肌细胞后,MMP-1、MMP-2 与 sCD147 可相互促进表达,使三者的表达均显著增加,进一步导致 MMP 通过诱导平滑肌细胞迁移、增殖和加速细胞外基质降解,促进 AS 斑块发展、新内膜形成及斑块破裂等病理现象^[12]。CD147 可能在 AS 病理进展过程中发挥了重要作用,而作用的机制与结果还有待于进一步的研究。

血脂水平升高是诱发 AS 的重要危险因素,影响心脑血管患者的健康与生存。使用降血脂类药物,可以延缓和部分逆转 AS 病灶的进展,预防斑块破裂和改善内皮细胞功能,降低心血管病的发病率和死亡率。本研究结果表明,HLP 组患者 sCD147 的表达水平显著高于健康对照组,其中 TC、TG 升高都与其 sCD147 水平呈正相关,提示 sCD147 可能与 HLP 之间存在一定的相关性。sCD147 与 TC、TG 升高之间作用机制如何,通过采用 siRNA、sCD147 抗体等降低 sCD147 后,再检测血脂指标的变化,进一步探讨 HLP 与 sCD147 的相应关系等都是后续研究的内容,不仅能为降血脂类药物开发提供新的临床思路,也可能为 HLP 的临床诊断提供新的技术指标。

参考文献

[1] 中国成人血脂异常防治指南制定联合委员会. 中国成人血脂异常防治指[J]. 中华心血管病杂志,2007,359(5):390-409.

[2] 邹宁,任云青,李培莉,等. CD147 蛋白和 MMP-9 在子宫腺肌病中的表达和意义[J]. 中国免疫学杂志,2011,27

(2):144-148.

[3] 岳红红,朱平,冷南,等. 可溶性 CD 147 与类风湿关节炎动脉粥样硬化危险因素的相关性[J]. 中华风湿病学杂志,2008,12(8):515-518.

[4] 岳红红. CD147 在 RA 相关动脉粥样硬化发病中的作用及其机制的初步研究[D]. 西安:第四军医大学,2008.

[5] 聂珍珠,唐志鹏,王书奎. CD147 在肿瘤诊断及预后判断中的作用研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(6):743-746.

[6] Tang Y, Kesavan P, Nakada, MT, et al. Tumor-stroma interaction: Positive feedback regulation of EMMPRIN expression and MMP-dependent generation of soluble EMMPRIN[J]. Molecular Cancer Research, 2004, 2(2): 73-80.

[7] 王芳,徐军,李怀玉,等. 138 例高脂血症患者血液流变学指标检测分析[J]. 检验医学与临床,2011,8(14):1744-1745.

[8] 李娇红,李小刚. 低密度脂蛋白致高脂血症及动脉粥样硬化性脑梗死的机制[J]. 西南军医,2012,14(3):518-520.

[9] 聂桂丽,王燕,甘萍. CD147 与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 实验室科学,2009,8(4):83-86.

[10] 蒋远伟,王德生. CD147 与喉鳞状细胞癌侵袭和转移关系的研究[J]. 福建医药杂志,2011,33(3):68-70.

[11] 余世明,初同伟,廖通权,等. CD147 抗体对破骨细胞中基质金属蛋白酶活性影响的体外研究[J]. 中国免疫学杂志,2012,28(3):205-209.

[12] 李蓉,蔡辉. CD147 在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J]. 微循环学杂志,2011,21(2):68-70.

(收稿日期:2013-01-26 修回日期:2013-03-18)

(上接第 1933 页)

作用,与此同时,开发一种经过一段时间后可以被组织吸收代谢的生物材料作为载体将成为新的研究方向。

参考文献

[1] Nakhgevany KB, Mobini J, Bassett JG, et al. Nonabsorbable radioactive material in the treatment of carcinomas by local injections[J]. Cancer, 1988, 61(5):931-940.

[2] Zhang DS, Liu L, Jin LQ, et al. Effect of phosphorus-32 glass microspheres on human hepatocellular carcinoma in nude mice[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(11):1551-1554.

[3] Wu WG, Zhang CQ, Yuan SZ, et al. Experimental study of intra-tumor injection of radionuclide ³²P to treat pancreatic carcinoma[J]. Chin J Pract Surg, 2000, 20(6):356-358.

[4] Jiang Z, Liu L, Fang W, et al. Hepatoartery radioembolism chemotherapy in treatment of hepatic carcinoma[J]. Pract J Cancer, 2001, 16(6):634-636.

[5] Zhang XR, Zheng L, Chen DF, et al. Efficacy of selective internal radioembolization with phosphorus-32 glass microspheres combining with hepatic arterial embolization

on advanced liver Cancer[J]. Chinese J Hepatology, 2003, 11(6):337.

[6] Homas T, Thomast J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications[J]. Cell Mol Life Sci. 2001, 58(2):244-258.

[7] Lyer R, Lehnert BE. Factors underlying the cell growth related bystander responses to alpha particles[J]. Cancer Res, 2000, 60(5):1290-1298.

[8] Eymour C, Mothersl LC. Cell communication and the bystander effect[J]. Radiat Res, 1999, 151(4):505-506.

[9] 王永跃,王大章,郑光勇. (32)磷玻璃微球组织内照射对肿瘤细胞凋亡影响的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2001,9(2):116-117.

[10] Lee JU, Hosotani R, Wada M, et al. Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic Cancer cells[J]. Eur J Cancer, 1999, 35(9):1374-1380.

[11] 蔡长青,廖万清,刘文哲,等. 放射治疗质量保证的管理[J]. 现代医院,2006,6(12):111-112.

(收稿日期:2013-01-10 修回日期:2013-03-12)