

## • 实验研究 Experiment research •

## 吉西他滨对人胆管癌裸鼠移植瘤模型放射增敏作用的实验研究

王剑锋, 杨伟志, 黄 强, 钱晓军, 翟仁友

**【摘要】 目的** 评价吉西他滨对人胆管癌裸鼠移植瘤的放射增敏作用。**方法** 建立人胆管癌裸鼠移植瘤模型, 60 只荷瘤鼠随机分为 4 组: 空白对照组、单纯药物组、单纯放射治疗组、吉西他滨联合放射治疗组。单纯照射组和联合治疗组根据照射剂量不同各分为 3 个亚组。对照组经腹腔注射生理盐水, 单纯药物组经腹腔注射吉西他滨 50 mg/kg; 联合治疗组经腹腔注射吉西他滨 50 mg/kg, 24 h 后分别进行单次 10、15 和 20 Gy 的照射; 隔日测量移植瘤的最大径及最小径, 计算肿瘤体积及生长延缓天数等, 利用增敏系数(EF)评价吉西他滨的放射增敏作用。**结果** 单纯照射组各亚组肿瘤生长受到不同程度的抑制; 联合治疗组较其他实验组肿瘤生长明显受到抑制, 10、15 和 20 Gy 3 个亚组的 EF 值分别为 1.14、1.74 和 2.08; 20 Gy 亚组延缓天数最长, 且大于单纯药物组和单纯照射组延缓天数之和。**结论** 照射组前 24 h 给予吉西他滨对人胆管癌裸鼠移植瘤具有明显的放射增敏效应。

**【关键词】** 胆管癌; 吉西他滨; 放射治疗; 放射增敏

中图分类号: R735.8 文献标识码: B 文章编号: 1008-794X(2007)-10-0685-03

**Radioenhancement on cholangiocarcinoma by gemcitabine in vivo** WANG Jian-feng, YANG Wei-zhi, HUANG Qiang, QIAN Xiao-jun, ZHAI Ren-you. Department of Radiology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China

**【Abstract】 Objective** To evaluate the radioenhancement of gemcitabine on human cholangiocarcinoma grafted in nude mice. **Methods** Tumour-bearing model was established by injecting cholangiocarcinoma cells (QBC939) to nude mice. Mice bearing cholangiocarcinoma were randomly divided into four groups: control group, gemcitabine group, radiation group, combination of gemcitabine and radiation group. The radiation group and combination group were divided into 3 subgroups according to the dose of radiation (10 Gy, 15 Gy, 20 Gy). Each group comprised 15 mice. Gemcitabine was injected as 50 mg/kg. Tumors were measured every other day using vernier calipers. The tumor volume and growth delay were calculated. The enhancement factor (EF) was used to evaluate the radiation enhancement. **Results** Tumor growth inhibition in combination group was higher than those of radiation group and gemcitabine group ( $P < 0.05$ ). The values of EF were 1.22, 1.39, 1.74 in subgroups (10 Gy, 15 Gy, 20 Gy) of GR group, respectively. The longest time of tumor growth delay were 54 days in combination group. **Conclusions** Gemcitabine possesses radioenhancing property for cholangiocarcinoma. The highest EF value of gemcitabine was observed at 24 h after the administration. (J Intervent Radiol, 2007, 16: 685-687)

**【Key words】** Cholangiocarcinoma; Gemcitabine; Radiotherapy; Radiation enhancement

胆管癌发病隐匿, 早期诊断困难, 根治性手术切除率低, 术后 5 年生存率为 5% ~ 10%。提高胆管

癌患者生存率的出路在于早期诊断, 提高手术切除率及放化疗等综合治疗疗效<sup>[1,2]</sup>。已证明吉西他滨对胰腺癌和非小细胞肺癌具有放射增敏作用, 且不良反应小<sup>[3,4]</sup>。本实验目的在于探讨吉西他滨对人胆管癌裸鼠移植瘤放射治疗的增敏作用。

基金项目: 国家十一五课题资助项目 (2007BAI05B06)

作者单位: 100020 北京首都医科大学附属朝阳医院放射科 (王剑锋、黄 强、钱晓军、翟仁友); 中国协和医科大学附属肿瘤医院 肿瘤研究所 (杨伟志)

通讯作者: 翟仁友

## 1 材料和方法

## 1.1 实验材料

4 ~ 6 周龄,裸鼠,体重 18 ~ 22 g,雄雌兼用,购自中国医学科学院动物研究所。人胆管癌细胞株(QBC939)由第三军医大学附属西南医院王曙光教授惠赠。实验药品和试剂:①吉西他滨(健择):200 mg/瓶, Lilly 公司。②小牛血清:美国 Sigma 公司。③RPMI1640 培养液, Gibco 公司。

实验仪器:①Varian 600C 直线加速器(美国),剂量率 250 cGy/min。②游标卡尺,北京量器厂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 荷 QBC939 人胆管癌裸鼠模型建立

1.2.1.1 引瘤鼠接种:将 QBC939 人胆管癌细胞株置于 1640 完全培养液中传代 1 周,制成 1 ml 含  $10^6 \sim 10^7$ /L 个细胞的悬液。每只鼠右下肢皮下注入 0.2 ml 瘤细胞悬液。

1.2.1.2 荷瘤鼠模型建立:引瘤鼠肿瘤长至直径约 0.8 ~ 1 cm 后,处死引瘤鼠,在超净台剥离出肿瘤,用生理盐水、庆大霉素消毒冲洗,制成小瘤块(约 1 mm<sup>3</sup>)。每只鼠右下肢皮下注射含瘤块(2 ~ 3 块)的生理盐水,待 10 ~ 15 d 后小鼠右下肢肿瘤最大径至 0.8 cm 左右时开始实验。

1.2.2 实验分组 将 60 只荷瘤鼠随机平分为 4 组:空白对照组、单纯药物组、单纯照射组、吉西他滨联合放射治疗组(联合治疗组)。其中单纯照射组和联合治疗组各分为 3 个亚组,每个亚组各 5 只。空白对照组不进行放射治疗及药物治疗,仅注射生理盐水;单纯药物组经腹腔注射吉西他滨 50 mg/kg;单纯照射组按 10、15 和 20 Gy 剂量分亚组进行单次照射;联合治疗组腹腔注射吉西他滨 50 mg/kg, 24 h 后分别按照上述剂量分亚组单次照射。

1.2.3 照射方法 将荷瘤裸鼠装入一自制的有机玻璃盒内,并将其接种肿瘤的后腿拉出用胶布固定。肿瘤部位位于照射野中央,距野边缘均超过 1 cm。小鼠全身其余部位均在照射野之外。在清醒状态、空气条件下,采用直线加速器下进行,射线为 6 MV X 射线。照射部位上垫 1.5 cm 蜡块做为填充物。各组鼠在同一时间进行照射,照射剂量率为 250 cGy/min。

1.2.4 给药方法 根据实验分组方法和每只鼠体重计算给药剂量,腹腔注射已稀释好的药液,对照组注射同等体积生理盐水,注射药液剂量低的个体补充生理盐水使注射液体体积一致。

1.2.5 评价方法 分组后,观察荷瘤鼠一般情况,实验中采用盲法隔日由专人用游标卡尺测量移植

瘤的最大径(A)及其最小径(B),并按肿瘤体积计算公式  $V = \pi/6 \cdot A \cdot B^2$  计算肿瘤体积。

当各组肿瘤的体积增长至 2 倍时为实验终止点。肿瘤生长延缓时间:绝对肿瘤生长延缓时间(AGD, absolute growth delay) = TR-TC(TR 为单纯照射组小鼠瘤体积增长 2 倍天数,TC 为对照组小鼠瘤体积增长 2 倍天数)。规格化肿瘤生长延缓时间;标准化肿瘤生长延缓时间(NGD, normalized growth delay) = TL-TG(TL 为联合治疗组小鼠瘤体积增长 2 倍的天数,TG 为单纯药物组小鼠瘤体积增长 2 倍的天数);增敏系数(EF) = NGD/AGD, EF > 1 提示有放射增敏效应<sup>[5]</sup>。

## 1.3 统计方法

采用 SPSS 11.5 统计软件绘制肿瘤生长曲线,统计方法采用方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义; $P < 0.01$  为差异高度统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 荷瘤鼠一般情况

分组治疗后随时间的推移,对照组和单纯药物组小鼠进食、活动明显减少,右下肢肿瘤局部皮肤可见溃烂;而单独照射和联合治疗组小鼠活动及进食未受影响,未见右下肢皮肤溃烂现象。

### 2.2 肿瘤生长曲线

根据各组小鼠肿瘤平均体积,绘制肿瘤生长曲线。空白对照组、单纯药物组肿瘤生长情况相似;单纯照射组不同的亚组肿瘤生长受到不同程度的抑制,20 Gy 亚组抑制最明显;药物加照射组肿瘤生长明显受到抑制,尤以 20 Gy 亚组最明显。

### 2.3 肿瘤生长延缓时间及增敏系数

联合治疗组 10、15 和 20 Gy 3 个亚组的 EF 值分别为 1.14、1.72 和 2.08;15 和 20 Gy 2 个亚组延缓天数最长,且大于吉西他滨组和单纯照射组延缓天数之和( $P < 0.05$ ),最长延缓时间为 54 d(见表 1)。

表 1 各组移植瘤平均最大生长延缓时间和增敏系数

组别	生长天数	延缓天数	增敏系数
对照组	4.0 ± 1.2		
单独药物组	8.0 ± 1.1	4	
单纯放射组			
10 Gy	11.0 ± 1.6	7	
15 Gy	22.0 ± 1.3	18	
20 Gy	30.0 ± 2.1	26	
联合治疗组			
10 Gy	14.0 ± 1.4	8	1.1
15 Gy	41.0 ± 1.8	33	1.7
20 Gy	62.0 ± 2.4	54	2.1

### 3 讨论

胆管癌早期无症状,多以梗阻性黄疸就诊,早期诊断率在 10% 左右,对于早期病例,通常采用手术治疗。现有的文献报道对无法手术切除的患者进行放疗能明显的提高生存期及生活质量<sup>[2,6]</sup>。但一些临床研究发现放疗并未明显的延长患者的生存期,部分学者认为患者放疗失败的主要原因由于肿瘤组织对于放射的抵抗性及放射剂量不够造成的局部肿瘤复发<sup>[7,8]</sup>。近年来放疗和化疗的结合在肿瘤治疗中取得了很大成功,明显提高肿瘤局部控制率。鼻咽癌、肺癌等多种恶性肿瘤治疗中证明,放、化疗与单纯放疗相比,不仅可以提高肿瘤控制率,还可以增加患者生存时间<sup>[9,10]</sup>。

吉西他滨的放射增敏作用机制之一是其可引起肿瘤细胞群中对放射耐受的 S 期细胞减少,并使存活细胞同步进入对放射敏感的周期 G2 和 M 期。吉西他滨的细胞毒作用使细胞数减少,增加了肿瘤细胞的再氧合,使原先不敏感的乏氧细胞对放射敏感<sup>[11,12]</sup>。并已成为临床同步放化疗研究应用最广泛的药物之一,相关的结果也证实了它能有效提高胰腺癌、非小细胞肺癌和头颈部恶性肿瘤的疗效<sup>[3,4,13]</sup>。近年来有报道将吉西他滨应用到胆管癌的治疗中,近期治疗有效率比单纯放疗有一定提高<sup>[14,15]</sup>。

从肿瘤生长曲线来看,对照组和单纯药物组肿瘤生长未受到抑制。单纯照射组不同亚组的肿瘤均受到不同程度的抑制,随着照射剂量的增加,肿瘤的生长延缓时间也延长,20 Gy 亚组肿瘤生长延缓时间最长,为 26 d。而联合治疗组肿瘤生长延缓天数明显优于单独照射组及单独药物组,不同亚组的 EF 值均大于 1,说明在照射前腹腔注射吉西他滨有不同程度的放射增敏作用;随着剂量的增加,其 EF 值也逐渐的增高,在 20 Gy 时达到最高值 2.08。

本实验结果显示吉西他滨联合放射线照射对人胆管癌裸鼠移植瘤具有一定放射增敏作用。但本研究照射为单次照射,照射剂量较大,所以需要进一步进行常规分割照射与药物结合的疗效观察。

### 〔参考文献〕

[1] Francesco D, Gennaro C, Gian CM, et al. Chemoradiation and brachytherapy in biliary tract carcinoma: long-term results [J].

- Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 64: 483 - 488.
- [2] Morganti AG, Trodella L, Valentini V, et al. Combined modality treatment in unresectable extrahepatic biliary carcinoma[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000, 46: 913 - 919.
- [3] de Lange SM, van Groenigen CJ, Meijer OWM, et al. Gemcitabine-radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer [J]. Eur J Cancer, 2002, 38: 1212 - 1217.
- [4] Van Putten JWG, van der Leest AH. A phase I study of gemcitabine with concurrent radiotherapy in stage III, locally advanced non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9: 2472 - 2477.
- [5] Milas L, Fujii T, Nancy Hunter N, et al. Enhancement of tumor radioresponse in vivo by gemcitabine [J]. Cancer Res, 1999, 59: 107 - 114.
- [6] Foo ML, Gunderson LL, Bender CE, et al. External radiation therapy and transcatheter iridium in the treatment of extrahepatic bile duct carcinoma [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997, 39: 929 - 935.
- [7] Bowling TE, Galbraith SM, Hatfield AR, et al. A retrospective comparison of endoscopic stenting alone with stenting and radiotherapy in non-resectable cholangiocarcinoma [J]. Gut, 1996, 39: 852 - 855.
- [8] Fritz P, Brambs HJ, Schraube P, et al. Combined external beam radiotherapy and intraluminal high dose rate brachytherapy on bile duct carcinomas[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994, 29: 855 - 861.
- [9] Daoud J, Frikha M. Carcinoma of the nasopharynx. radiotherapy modalities and combined radiotherapy and chemotherapy: state of the art and perspectives [J]. Cancer Radiother, 2001, 5 (Suppl): 1195s - 1200s.
- [10] Bernstein ED, Herbert SM, Hanna NH. Chemotherapy and radiotherapy in the treatment of resectable non-small-cell lung cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2006, 13: 291 - 301.
- [11] 李淑娟, 蒋进军, 白春学. 吉西他滨对 Lewis 肺癌放射增敏的实验研究[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2005, 25: 84 - 87.
- [12] Mose S, Class R, Weber HW, et al. Radiation enhancement by gemcitabine-mediated cell cycle modulations [J]. Am J Clin Oncol, 2003, 26: 60 - 69.
- [13] Rosier JF, Michaux L, Ameye G, et al. The radioenhancement of two human head and neck squamous cell carcinomas by 2'-2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine; dFdC) is mediated by an increase in radiation-induced residual chromosome aberrations but not residual DNA DSBs[J]. Mutat Res, 2003, 527: 15 - 26.
- [14] Pauwels B, Korst AEC, Lardon F, et al. Combined modality therapy of gemcitabine and radiation[J]. The Oncologist, 2005, 10: 34 - 51.
- [15] Khan SA, Thoma HC, Davidso BR, et al. Cholangiocarcinoma [J]. Lancet, 2005, 366: 1303 - 1314.

(收稿日期:2007-03-06)