

## • 实验研究 Experimental research •

不同活度  $^{125}\text{I}$  粒子植入抑制兔 VX2 肝癌  
机制研究

王伟昱, 秦汉林, 朱先海, 周磊, 武乐斌

**【摘要】目的** 探讨  $^{125}\text{I}$  粒子组织间植入诱导肝癌细胞凋亡的机制。比较不同活度  $^{125}\text{I}$  粒子组织间植入诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖的作用强度。**方法** 将 24 只兔 VX2 肝癌模型随机分为 3 组, 分别植入不同初始活度的  $^{125}\text{I}$  粒子: 0 mCi 组(对照组,  $n=8$ )、0.7 mCi 组( $n=8$ )及 1.0 mCi 组( $n=8$ )。5 周后处死实验兔, 取出肿瘤病灶, 检测  $^{125}\text{I}$  粒子对肿瘤细胞凋亡、肿瘤生长相关因子表达的影响及 caspase-3 活性改变。**结果** 不同初始活度  $^{125}\text{I}$  粒子均可使肿瘤细胞凋亡率上升, Bcl-2、VEGF 表达下调, Bax 表达上调, 1.0 mCi  $^{125}\text{I}$  粒子组作用均更加明显( $P<0.05$ )。不同初始活度  $^{125}\text{I}$  粒子可增加肿瘤组织中 caspase-3 活性, 两治疗组间差异无明显统计学意义( $P>0.05$ )。**结论**  $^{125}\text{I}$  粒子植入后不仅通过诱导肿瘤细胞凋亡抑制肿瘤生长、增殖, 还影响凋亡相关基因及编码蛋白表达, 抑制肿瘤细胞新生血管生成。

**【关键词】**  $^{125}\text{I}$  粒子; VX2 肝癌模型; 抑癌机制; 凋亡

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2015)-05-0426-04

**The inhibition effect of interstitial brachytherapy with different radioactivity  $^{125}\text{I}$  seeds on liver VX2 tumor in experimental rabbits: study of its mechanism** WANG Wei-yu, QIN Han-lin, ZHU Xian-hai, ZHOU Lei, WU Lei-bin. Department of Interventional Radiology, Anhui Provincial Tumor Hospital, Hefei, Anhui Province 230001, China

Corresponding author: WANG Wei-yu, E-mail: wwy901@sohu.com

**【Abstract】Objective** To explore the mechanism of  $^{125}\text{I}$  seed interstitial implantation-induced apoptosis of liver VX2 tumor cells in experimental rabbits, and to compare the effects of different radioactivity  $^{125}\text{I}$  seeds on the apoptosis and on the proliferation of tumor cells. **Methods** A total of 24 rabbit models with VX2 liver cancer were randomly and equally divided into 3 groups, and  $^{125}\text{I}$  seeds with different initial radioactivity were separately implanted into the rabbits of the three groups.  $^{125}\text{I}$  seeds of 0 mCi radioactivity were used in the control group ( $n=8$ ),  $^{125}\text{I}$  seeds of 0.7 mCi radioactivity were used in the 0.7 mCi group ( $n=8$ ) and  $^{125}\text{I}$  seeds of 1.0 mCi radioactivity were used in the 1.0 mCi group ( $n=8$ ). The experimental rabbits were sacrificed at 5 weeks after the implantation; the tumor lesions were removed, and the effects of  $^{125}\text{I}$  seeds on the apoptosis and proliferation of tumor cells were determined. The tumor cell apoptosis rate, tumor growth-related factors, tumor growth factor expression protein and the influence of caspase-3 activity were evaluated. **Results** Regardless of their initial radioactivity, all the  $^{125}\text{I}$  seeds could make the tumor cell apoptosis rate increased, make Bcl-2 and VEGF expression level decreased, and make Bax expression increased, which were more obvious in 1.0 mCi group ( $P<0.05$ ). The  $^{125}\text{I}$  seeds could increase the activity of caspase-3 within tumor tissue, but the difference between the 0.7 mCi group and the 1.0 mCi group was not significant ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The implanted  $^{125}\text{I}$  seeds can not only inhibit tumor's growth through inducing apoptosis of tumor cells, but also inhibit tumor's angiogenesis through influencing the expression of apoptosis-related gene and coding protein. (J Intervent Radiol, 2015, 24: 426-429)

**【Key words】**  $^{125}\text{I}$  seed; VX2 liver tumor model; tumor-inhibiting mechanism; apoptosis

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2015.05.016

作者单位: 230001 合肥 安徽省肿瘤医院肿瘤介入科(王伟昱、秦汉林、朱先海、周磊); 山东省医学影像研究所(武乐斌)

通信作者: 王伟昱 E-mail: wwy901@sohu.com

肝癌是目前最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。<sup>125</sup>I 粒子组织间植入治疗原发性肝癌逐渐得到临床认可并推广。但其治疗肝癌的机制目前报道较少。*Bcl-2* 及 *Bax* 是目前研究最多的凋亡相关基因, VEGF 是目前所知最强的促血管生成因子。本研究主要采用分子生物学技术观察不同活度 <sup>125</sup>I 粒子组织间植入对肝癌细胞 *Bcl-2*、*Bax*、VEGF 基因 mRNA 及蛋白表达的影响, 探讨 <sup>125</sup>I 粒子组织间植入杀伤肝癌细胞的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 兔 VX2 肝癌模型制作

选取成年健康新西兰白兔 36 只, 体重 2~3 kg, 平均体重 (2.5±0.32)kg, 由安徽医科大学实验动物中心提供。采用 VX2 肝癌细胞株进行细胞培养, 收集细胞混悬液注射到新西兰大耳白兔双侧后肢皮下, 建立荷瘤动物移植瘤种兔模型。2 周后将荷瘤种兔处死, 取出肿瘤灶并选取肿瘤组织中有活性部分, CT 引导下以 VX2 肿瘤组织块接种法制备兔 VX2 肝移植瘤模型。观察瘤兔生活状况并定期复查 CT 观察肿瘤生长情况。根据 CT 扫描图像中肿瘤长径大小计算出肿瘤体积 (肿瘤体积  $V=1/2 a \times b^2$ , 其中  $a$  为病灶长径,  $b$  为病灶短径)。

### 1.2 实验分组及 <sup>125</sup>I 粒子植入

选取荷瘤兔体重及肝肿瘤体积大小无明显差异的 VX2 肝癌模型 24 只, 随机分为 3 组, 每组 8 只。实验前采用治疗计划系统 (TPS) (北京航空航天大学、中国原子能科学研究所和北京原博创新高科技有限公司联合研发) 制定合适的治疗计划<sup>[2-3]</sup>。按照

治疗计划, CT 引导下用粒子植入器予以 3 组实验模型分别植入初始活度为 0 mCi、0.7 mCi 及 1.0 mCi 的 <sup>125</sup>I 粒子。

### 1.3 免疫组织化学检测

由于 <sup>125</sup>I 粒子半衰期为 59.6 d, 考虑到时间过短, <sup>125</sup>I 粒子尚未引起肿瘤组织细胞大面积凋亡, 我们选择在 <sup>125</sup>I 粒子植入术后第 5 周处死实验兔。取出肿瘤病灶, 测量病灶重量, 采用流式细胞仪检测 <sup>125</sup>I 粒子植入对兔 VX2 肝癌细胞凋亡的影响; 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 分别检测 <sup>125</sup>I 粒子植入对肿瘤细胞凋亡与生长高度相关基因 VEGF、*Bcl-2*、*Bax* 基因 mRNA 表达的影响, 计算实时  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值; 提取肿瘤组织蛋白后进行蛋白定量分析, 采用免疫印迹法测定 <sup>125</sup>I 粒子近距离植入对 VEGF、*Bcl-2* 和 *Bax* 蛋白表达的影响; 采用半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 (caspase)-3 活性检测试剂盒分别检测肿瘤组织裂解液中 caspase-3 酶活性变化。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。所有数据均以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组均值比较用  $t$  检验, 组间差异用 ANOVA、Dunnett 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 <sup>125</sup>I 粒子对兔 VX2 肝癌细胞凋亡的影响

<sup>125</sup>I 粒子植入 4 周后, 两实验组肿瘤细胞凋亡率与对照组相比显著增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 0.7 mCi <sup>125</sup>I 粒子治疗组相比, 1.0 mCi 组对 VX2 肝癌细胞凋亡的影响更加明显 ( $P < 0.05$ ) (见图 1)。

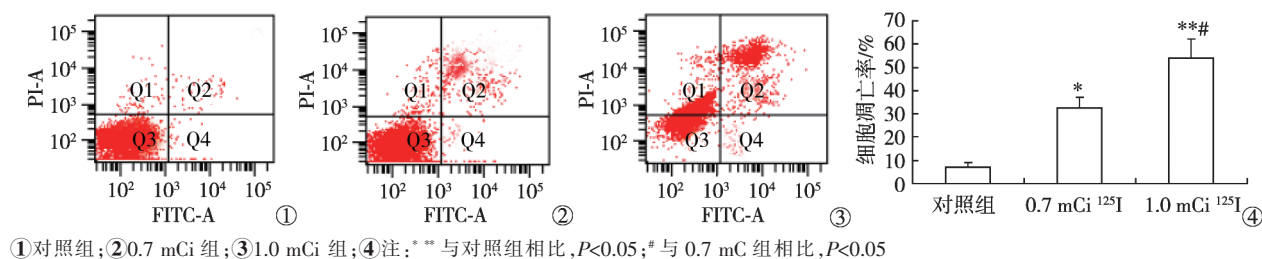


图 1 <sup>125</sup>I 粒子对兔 VX2 肝癌细胞凋亡的影响

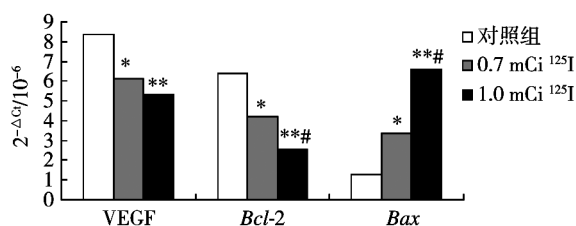
### 2.2 <sup>125</sup>I 粒子对兔 VX2 肝癌组织中 VEGF、*Bcl-2* 和 *Bax* 基因 mRNA 表达的影响

<sup>125</sup>I 粒子植入后, 肿瘤凋亡相关基因可发生显著改变。各组肿瘤组织中 VEGF、*Bcl-2*、*Bax* 基因 mRNA 表达情况见图 2。RT-PCR 检测 VEGF 结果

见图 3。

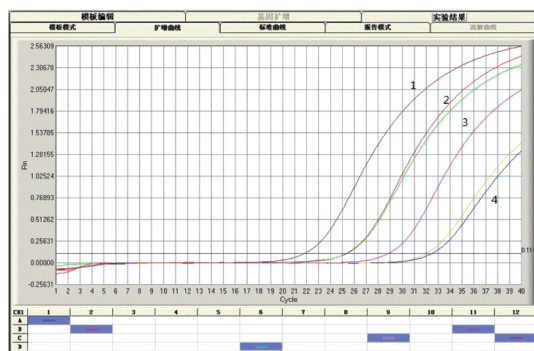
### 2.3 <sup>125</sup>I 粒子对兔 VX2 肝癌组织中 VEGF、*Bcl-2* 和 *Bax* 蛋白表达的影响

不同初始活度 <sup>125</sup>I 粒子植入治疗均可使 VEGF、*Bcl-2* 蛋白下调及 *Bax* 蛋白上调 (图 4)。



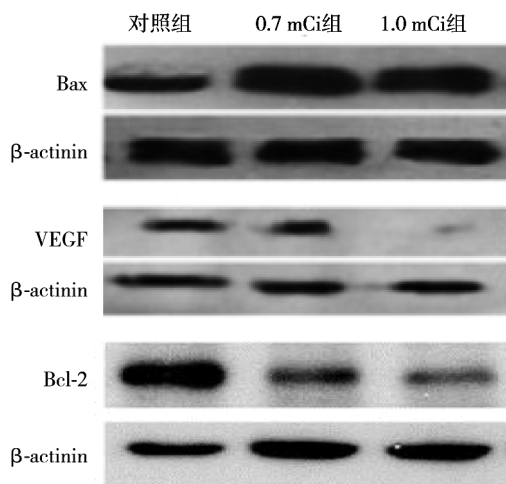
注: \* 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; # 与 0.7 mCi 组相比,  $P < 0.05$

图 2 <sup>125</sup>I 粒子植入治疗对兔 VX2 肝癌组织中凋亡与生长相关基因的影响



注: 1: 对照组; 2: β-actin; 3: 0.7 mCi 组; 4: 1.0 mCi 组

图 3 RT-PCR 检测 VEGF 曲线图



注: \* 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; # 与 0.7 mCi 组相比,  $P < 0.05$

图 4 <sup>125</sup>I 粒子植入治疗对兔 VX2 肝癌组织中凋亡与生长相关蛋白的影响

## 2.4 <sup>125</sup>I 粒子对兔 VX2 肝癌组织 caspase-3 活性的影响

不同初始活度 <sup>125</sup>I 粒子植入兔 VX2 肝癌模型 4 周后, caspase-3 活性显著增加, 两治疗组与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 1.0 mCi 组与 0.7 mCi 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 <sup>125</sup>I 粒子植入诱导肿瘤细胞凋亡

国外一些学者及国内少数学者认为 <sup>125</sup>I 粒子组

织间植入后, 在近距离放疗作用下, 肿瘤细胞死亡的主要形式为凋亡<sup>[4]</sup>。有研究对早期前列腺癌患者施行 CT 引导下 <sup>125</sup>I 粒子植入肿瘤组织内近距离照射治疗, 治疗前、后随访中通过活检检测肿瘤组织变化, 结果发现治疗后肿瘤组织中的凋亡细胞明显增加, 凋亡指数明显增加, 说明 <sup>125</sup>I 粒子近距离照射治疗肿瘤, 可以促进肿瘤细胞凋亡。我们将不同初始活度 <sup>125</sup>I 粒子植入兔 VX2 移植瘤中, 发现肿瘤细胞早期凋亡率逐渐上升, 1.0 mCi <sup>125</sup>I 粒子植入组对肿瘤细胞凋亡的影响更加明显, 说明 <sup>125</sup>I 粒子植入治疗对兔 VX2 移植瘤细胞凋亡的诱导作用具有剂量依赖性, 并再次证明了 <sup>125</sup>I 粒子的抗肿瘤机制是诱导肿瘤细胞凋亡。

肿瘤的发生发展是凋亡和抗凋亡失衡调节的过程, 其中 Bcl-2、Bax 作为 Bcl-2 家族中典型的抗凋亡成员和促凋亡成员日益受到关注。Bcl-2 主要发挥抑制细胞凋亡的作用, 因此在肿瘤发生中, Bcl-2 基因及其编码蛋白具有不同程度的表达增高。Bcl-2 在不同类型肿瘤及不同进展期肿瘤中的表达水平各不相同, 通常与肿瘤的恶性程度呈现正相关<sup>[5]</sup>。Bcl-2 过度表达, 抑制促凋亡蛋白, 如细胞色素 C 从线粒体中释放, 使凋亡蛋白酶 caspases 无法激活, 活性氧减少, 脂质过氧化物无法生成, 细胞内钙离子浓度异常, 延缓细胞发生凋亡, 导致细胞过度增殖、累积, 容易发生突变或使已发生突变的基因在异常增殖细胞内积聚, 进而促进肿瘤细胞发展。因此, Bcl-2 过度表达或异常表达是肿瘤细胞发生发展的一个重要机制<sup>[6]</sup>。而 Bax 可以拮抗 Bcl-2 的作用。Bax 可诱导促凋亡蛋白如细胞色素 C 从线粒体中释放, 激活 caspase-3, 促进活性氧生成, 促使细胞核碎裂, 细胞膜破坏, 从而引起细胞凋亡, 维持细胞正常增殖<sup>[7-8]</sup>。

本研究通过 RT-PCR 和免疫印迹分析等从基因和蛋白水平分别对 Bcl-2 及 Bax 基因 mRNA 及蛋白表达进行检测, 并检测 caspase-3 活性变化, 结果表明不同初始活度 <sup>125</sup>I 粒子作用于肿瘤后均可使 Bcl-2 mRNA 表达下调, 1.0 mCi <sup>125</sup>I 粒子植入组作用更加明显, 而不同初始活度 <sup>125</sup>I 粒子植入均可使 Bax mRNA 表达不同程度上调, 1.0 mCi <sup>125</sup>I 粒子植入组作用更加明显, 从表达的蛋白水平分析得到类似结果; 对 caspase-3 活性研究证实, 不同初始活度 <sup>125</sup>I 粒子植入均可显著增加肿瘤组织组织中 caspase-3 活性, 但两治疗组相比无显著性差异。以上结果说明, 不同初始活度 <sup>125</sup>I 粒子植入治疗通过



调节细胞周期使之阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期、调节 *Bcl-2* 和 *Bax* 基因及其表达发挥凋亡作用,同时使 caspase-3 活性增加,但 caspase-3 活性并不随 <sup>125</sup>I 粒子剂量增加而增加。本研究进一步证实 <sup>125</sup>I 粒子组织间植入治疗肿瘤的机制主要在于诱导肿瘤细胞凋亡,即通过下调 *Bcl-2*、上调 *Bax* 表达,最终激活凋亡执行者 caspase-3,且 <sup>125</sup>I 粒子活度越高,诱导凋亡效果越明显。

### 3.2 <sup>125</sup>I 粒子植入抑制肿瘤血管生成

肿瘤的发生发展不仅与细胞分化、增殖有关,而且依赖于新生血管的形成<sup>[9]</sup>。VEGF 是目前所知作用最强的促进血管形成因子,能刺激血管内皮细胞的有丝分裂和血管生成,调节血管发展,通过结合到受体生成血管和淋巴管<sup>[10]</sup>。VEGF 还能够通过保护肿瘤血管不受放疗介导的细胞毒作用降低肿瘤血管的放疗敏感性<sup>[11]</sup>。VEGF 表达及分泌增加可见于多种肿瘤,它对于判断肿瘤的发生发展、转移及预后有重要意义<sup>[12]</sup>。大量研究表明,抑制 VEGF 活性能显著抑制肿瘤的生长<sup>[13]</sup>。本研究通过 RT-PCR 和免疫印迹分析等从基因和蛋白水平对 VEGF 进行检测发现,不同初始活度 <sup>125</sup>I 粒子植入治疗均可使 VEGF mRNA 表达下调,而对照组 VEGF 呈高表达,两者有明显差异;我们认为对照组 VEGF 水平升高是由于肿瘤负荷大,肿瘤细胞增生导致的肿瘤细胞自分泌所致,两治疗组 VEGF mRNA 表达水平均降低,说明不同初始活度 <sup>125</sup>I 粒子均能通过产生低剂量率射线降低 VEGF mRNA 表达,破坏肿瘤血管内皮细胞,抑制肿瘤新生血管生成,有效抑制了肿瘤组织生长<sup>[14]</sup>。我们认为 <sup>125</sup>I 粒子通过抑制肿瘤新生血管生成杀伤肿瘤细胞,可能与以下因素有关:①<sup>125</sup>I 粒子持续低剂量照射降低了血管内皮细胞亚致死性损伤修复,提高了杀伤肿瘤效果;②<sup>125</sup>I 粒子通过抑制 VEGF 表达,降低了其对肿瘤血管的放射抵抗作用,从而促进射线对肿瘤血管内皮细胞的杀伤作用;③<sup>125</sup>I 粒子可通过抑制血管生成相关蛋白表达阻碍肿瘤血管生成;④杀伤肿瘤血管内皮细胞减少了肿瘤微血管生成,从而减少肿瘤血供及转移途径,达到杀灭肿瘤的目的。本组两治疗组组间比较显示 VEGF 表达水平无显著性差异,与文献报道一致<sup>[15]</sup>,说明兔 VX2 肝癌细胞及肿瘤血管内皮细胞对不同活度的 <sup>125</sup>I 粒子释放的低剂量射线均敏感,其对 VEGF 表达水平的影响与 <sup>125</sup>I 粒子初始活度无明显相关性。

### [参考文献]

- [1] Parkin DM, Bary F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 74-108.
- [2] 王忠敏, 黄 钢, 陈克敏, 等. 放射性粒子组织间植入治疗技术指南的建议[J]. 介入放射学杂志, 2009, 18: 641-644.
- [3] 张景俊, 首 峰, 李杰慧, 等. <sup>125</sup>I 粒子植入治疗肝脏边缘恶性肿瘤的临床应用[J]. 介入放射学杂志, 2010, 19: 878-881.
- [4] Dong S, Tang Q, Long M, et al. The cooperative effect of p53 and Rb in local nanotherapy in a rabbit VX2 model of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Nanomedicine, 2013, 8: 3757-3768.
- [5] Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, et al. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a Met/VEGFR2 complex[J]. Cancer Cell, 2012, 22: 21-35.
- [6] Aggarwal S, Devaraja K, Sharma SC, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. Clin Chim Acta, 2014, 436: 35-40.
- [7] Li M, Wang ZY, Xing Y, et al. A multicenter study on expressions of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in oral and maxillofacial squamous cell carcinoma[J]. Iran Red Crescent Med J, 2014, 16: 1804-1812.
- [8] Shi F, Zhang XS, Wu KT, et al. Metastatic malignant melanoma: computed tomography-guided I-125 seed implantation treatment [J]. Melanoma Res, 2014, 24: 137-143.
- [9] Beydoun N, Bucci JA, Chin YS, et al. Iodine-125 thin seeds decrease prostate swelling during transperineal interstitial permanent prostate brachytherapy[J]. J Med Imaging Radiat Oncol, 2014, 58: 109-116.
- [10] Chen M, He MY, Song YJ, et al. The cytoprotective role of gemcitabine-induced autophagy associated with apoptosis inhibition in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2014, 34: 276-282.
- [11] Wang J, Taylor A, Showell R, et al. Expression profiling and significance of VEGF-A, VEGFR2, VEGFR3 and related proteins in endometrial carcinoma[J]. Cytokine, 2014, 68: 94-100.
- [12] Mittal K, Koon H, Elson P, et al. Dual VEGF/VEGFR inhibition in advanced solid malignancies Clinical effects and pharmacodynamic biomarkers[J]. Cancer Biol Ther, 2014, 15: 975-981.
- [13] Nakade J, Takeuchi S, Nakagawa T, et al. Triple inhibition of EGFR, Met, and VEGF suppresses regrowth of HGF-triggered, erlotinib-resistant lung cancer harboring an EGFR mutation[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9: 775-783.
- [14] Bamias A, Tzannis K, Papatsoris A, et al. Prognostic significance of cytoreductive nephrectomy in patients with synchronous metastases from renal cell carcinoma treated with first-line sunitinib: A european multiinstitutional study [J]. Clin Genitourin Cancer, 2014, 12: 373-383.
- [15] Leng RB, Zha L, Tang LD. MiR-718 represses VEGF and inhibits ovarian cancer cell progression [J]. FEBS Lett, 2014, 588: 2078-2086.

(收稿日期:2014-11-03)

(本文编辑:边 佑)