

· 论 著 ·

# 氟尿嘧啶缓释剂植入对人结直肠癌裸鼠移植瘤生长抑制的观察\*

李 弘, 颜丽萍, 石晓萍

(广西壮族自治区桂林市第二人民医院消化内科 541001)

**摘要:**目的 观察氟尿嘧啶缓释剂植入对人结直肠癌裸鼠移植瘤生长抑制效果及其对肿瘤细胞半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(caspase-3)表达的影响。**方法** 用人结直肠癌 LoVo 细胞株建立 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤模型,并将其分为 4 组:磷酸盐缓冲液(PBS)尾静脉注射组(A组)、5-氟尿嘧啶(5-FU)尾静脉注射组(B组)、5-FU 瘤内注射组(C组)、氟尿嘧啶缓释剂植入组(D组)。用药 15 d 后记录肿瘤质量、瘤体体积,计算抑瘤率,瘤体 HE 染色,采用免疫组化法检测 caspase-3 的表达。**结果** 氟尿嘧啶缓释剂能够显著抑制结直肠癌移植瘤的生长,D组与 A、B、C 组肿瘤质量、体积比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );氟尿嘧啶缓释剂能上调 caspase-3 的表达,D组与 A、B、C 组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 氟尿嘧啶缓释剂比传统的氟尿嘧啶更能有效抑制结直肠癌移植瘤的生长,并可上调 caspase-3 的表达,提示氟尿嘧啶可能通过凋亡途径介导肿瘤细胞的凋亡而发挥抗肿瘤作用,其确切的抑瘤效果值得在临床化疗中推广。

**关键词:**结直肠肿瘤;氟尿嘧啶缓释剂;半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.26.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)26-3084-03

## Observation on growth inhibition of sustained-release fluorouracil implantation in nude mice with human colorectal carcinoma\*

Li Hong, Yan Liping, Shi Xiaoping

(Department of Gastroenterology, Guilin Municipal Second People's Hospital, Guilin, Guangxi 541001, China)

**Abstract: Objective** To observe the growth inhibition effect of sustained-release fluorouracil implantation in nude mice with human colorectal carcinoma and to discuss its influence on caspase-3 expression. **Methods** The colorectal carcinoma subcutaneous transplanted model with LoVo cell in BALB/c nude mice was established and divided into 4 groups randomly: the tail intravenous injection of PBS (A group), the tail intravenous injection of 5-FU group (B group), the intratumor injection of 5-FU group (C group); and the implant of sustained-release fluorouracil group (D group). After 15 d of medication, the tumor weight and tumor volume were recorded, the tumor inhibiting rates were calculated. The tumor tissues were observed by HE staining and detected the expression of caspase-3 by immunohistochemistry (IHC). **Results** Sustained-release fluorouracil could suppress the transplantation tumor growth significantly, the tumor weight and tumor volume in the D group had statistical differences compared with the A, B and C groups ( $P < 0.05$ ), which could up-regulated the expression of caspase-3, the differences between the D group with the A, B and C groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sustained-release fluorouracil can inhibit the growth of colorectal carcinoma transplantation tumor more effectively than conventional fluorouracil and up-regulate the expression of caspase-3, which prompts that sustained-release fluorouracil may play the anti-tumor role by inducing the tumor cell apoptosis via apoptosis pathway. Its definite tumor-inhibiting effect deserves to be promoted in clinical chemotherapy.

**Key words:** colorectal neoplasms; sustained-release fluorouracil; caspase-3

氟尿嘧啶至今仍是结直肠癌化疗的首选用药,其对结直肠癌有着确切的抑制作用。新型植入用缓释氟尿嘧啶是长效缓释抗肿瘤制剂,用其治疗恶性实体肿瘤对肿瘤预后有着相当大的改善,其优势在临床已有相关报道<sup>[1-3]</sup>。本研究旨在观察氟尿嘧啶缓释剂对裸鼠结直肠癌(colorectal cancer, CRC)移植瘤的抑制效果,以及验证其在抗结直肠癌方面的优势,以期能够进一步指导临床实践。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** BALB/c SPF 级裸鼠 32 只,雌性 15 只,雄性 17 只,4 周龄,体质量 18~20 g,购于桂林医学院动物实验中心,批号 SCXK 桂 2007-0001;LoVo 细胞系购于广西医科大学。

**1.2 试剂** RPMI-1640 培养基及胎牛血清(Hyclone 公司);兔抗人半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(cysteinyI aspartate spe-clfIc protease-3, caspase-3)多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);5-氟尿嘧啶(5-FU)注射液(25 mg/mL,上海旭东海普药业有限公司);氟尿嘧啶缓释制剂(芜湖中科技人有限公司,批号 20010826,每瓶 100 mg)。

### 1.3 方 法

**1.3.1 动物模型的建立** 细胞复苏、培养、传代,于细胞对数期收集细胞,做成浓度为  $1.5 \times 10^7$  的细胞悬液,裸鼠右前肢腋下注射 0.2 mL 细胞悬液(细胞浓度为  $3.0 \times 10^6$  个/只),10 d 左右肿瘤长至直径约 5 mm 为致瘤成功,将其分为 A 组:磷酸

\* 基金项目:广西壮族自治区桂林市科技攻关与新产品试制科研基金(20110119-5)。 作者简介:李弘(1970~),主治医师,本科,主要从事胃肠道肿瘤的防治方面的研究。

盐缓冲液(PBS)尾静脉注射组 8 只;B 组:5-FU 尾静脉注射组 8 只;C 组:5-FU 瘤内注射组 8 只;D 组:氟尿嘧啶缓释剂植入组 8 只。于致瘤成功后 5、10、15 d 给予 A 组 PBS 0.1 mL、B 组 5-FU(100 mg/kg)、C 组瘤内 5-FU(100 mg/kg)相应处理,每次分 3 次给药,D 组仅在成瘤后 5 d 植入氟尿嘧啶缓释剂(100 mg/kg)。药物干预 15 d 后,处死裸鼠测定瘤体大小[测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b),瘤体体积(V)=0.5a×b<sup>2</sup>],肿瘤质量。抑瘤率=[1-实验组平均肿瘤质量(B、C、D 组为实验组)/A 组平均肿瘤质量×100%],瘤体甲醛固定,石蜡包埋,常规 HE 染色后免疫组化检测 caspase-3。

1.3.2 免疫组化及其结果判定

1.3.2.1 免疫组化法检测 caspase-3 蛋白的表达水平 石蜡切片脱蜡和水化后,用 PBS(pH7.4)冲洗 3 次,每次 3 min;对组织抗原进行修复;每张切片加 1 滴或 50 μL 13% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温下孵育 10 min,阻断内源性过氧化物酶。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;除去 PBS 液,每张切片滴加 1 滴或 30 μL 的 caspase 抗体(1:100 稀释在 0.01 mol/mL PBS 中),室温下孵育 30 min 或 4℃ 过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;除去 PBS 液,每张切片滴加 1 滴或 30 μL 即用型 Maxvision<sup>TM</sup> 快捷免疫组化试剂,室温下孵育 10~15 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;除去 PBS 液,每张切片滴加 2 滴或 100 μL 新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 3~5 min;自来水冲洗,苏木精复染,PBS 或自来水冲洗反蓝,经过梯度乙醇脱水干燥,二甲苯透明,中性树脂胶封固。37℃ 水箱孵育 40 min,PBS 冲洗,干燥后镜检计数。

1.3.2.2 免疫组化结果判定 caspase-3 蛋白阳性染色以细胞质呈黄色至棕黄色为主。在 400 倍镜下的染色最强区域中,每张组织切片选 10 个视野,使用目镜网格微尺计数 1 000 个细胞,阳性细胞率=阳性细胞数/肿瘤细胞数×100%。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)、多个

均数之间两两比较采用 *q* 检验。

2 结 果

2.1 移植瘤体生长情况、肿瘤质量及抑瘤率 32 只动物均在 10 d 左右成瘤,成瘤率 100%。D 组与 A、B、C 组 30 d 后肿瘤体积比较差异均有统计学意义( $P < 0.05, F = 27.01$ ),D 组与 A、B、C 组肿瘤质量比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );D 组抑瘤率较 A 组明显升高,见表 1。

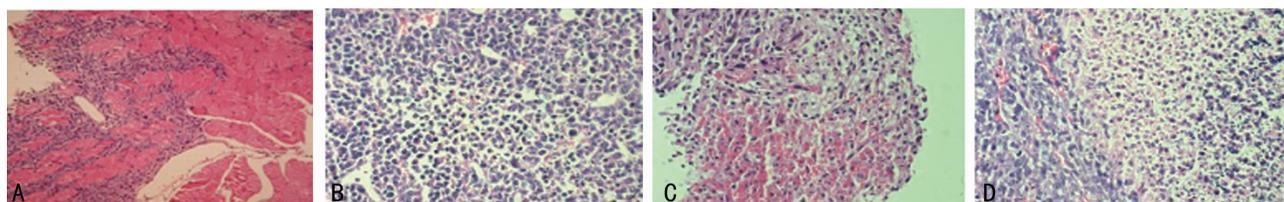
表 1 各组 caspase-3 的表达以及肿瘤质量及抑瘤率( $\bar{x} \pm s$ )

组别	caspase-3 (%)	瘤体体积 (mm <sup>3</sup> )	肿瘤质量 (mg)	抑瘤率 (%)
A	6.75±1.66	3 672±808	2.88±0.22	—
B	21.13±3.67	2 421±467	2.31±0.21	19.8
C	48.50±6.62	1 663±692	1.36±0.25	52.8
D	72.88±4.51 <sup>▲</sup>	951±501 <sup>*</sup>	0.51±0.11 <sup>#</sup>	82.3

▲:  $P < 0.05$ ,与 A 组比较;\*:  $P < 0.05$ ,与 B 组比较;#:  $P < 0.05$ ,与 C 组比较;—:表示此项无数据。

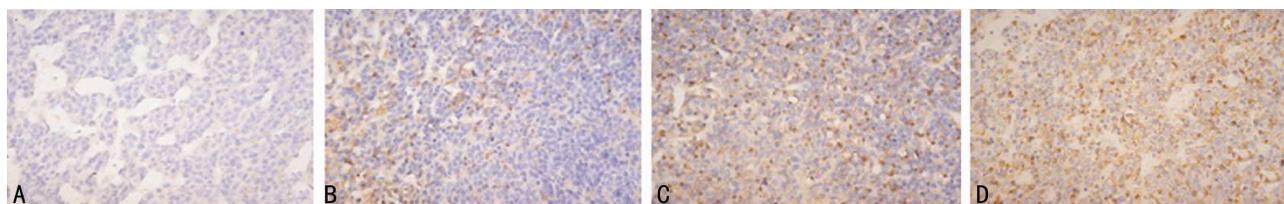
2.2 HE 染色结果 A 组肿瘤细胞腺管形成、散在少量凋亡、有片状坏死;肿瘤组织侵袭到脂肪、肌层组织。B 组肿瘤细胞异型性明显,恶性程度高,腺管状结构不明显,小区肿瘤细胞有小片凋亡,有小片出血坏死;肿瘤组织有局部侵袭到脂肪组织。C 组肿瘤细胞异型性明显,腺管样结构不明显,小区肿瘤细胞片状凋亡,可见出血坏死灶;肿瘤边界清楚,未见明显侵袭。D 组肿瘤细胞异型性不明显,腺管状结构不明显,小区肿瘤细胞凋亡明显,仅有少量坏死,肿瘤组织边界清晰,未见侵袭脂肪及肌层组织,生长缓慢(图 1)。

2.3 caspase-3 免疫组化结果 caspase-3 的表达 A、B、C、D 组是呈现逐渐上升的趋势(图 2)。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 1 各组 HE 染色结果(×400)



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 2 各组 caspase-3 的表达情况(×400)

3 讨 论

CRC 是近年来发病率上升最快的消化道恶性肿瘤之一,其病死率也逐步上升<sup>[4]</sup>。CRC 发病率在全世界位于肺癌、胃

癌、乳腺癌之后居恶性肿瘤第 4 位,其病死率居第 3 位。在肿瘤的治疗方面,手术为主要方法,但放化疗对预后及防止复发十分重要。氟尿嘧啶一直是 CRC 的首选化疗药物,近年来发

展的缓释给药系统使化疗药物能够持续稳定地释放,且维持有效的药物浓度,从而起到显著的杀灭肿瘤细胞的效果。氟尿嘧啶缓释剂较多用于外科手术中实体肿瘤切除后对肿瘤周边组织的化疗<sup>[5-7]</sup>,从而杀灭肿瘤的微转移灶,对肿瘤的复发及预后具有相当大的改善。

本研究的 HE 染色及抑瘤率结果表明氟尿嘧啶缓释剂在对肿瘤的抑制方面比常规氟尿嘧啶制剂更有优势,其对肿瘤的抑制杀灭效果更好,这可能归功于缓释给药系统使药物能够达到较高的浓度,且作用持久<sup>[8]</sup>,将其用于结直肠癌术后的植入,对肿瘤微转移的杀灭有相当大的作用。特别是对于晚期或者不适合做手术的患者,植入缓释剂是个理想的选择。

caspase-3 在细胞凋亡 caspase 级联反应中处于执行者的核心位置<sup>[9]</sup>,是细胞凋亡发生的关键步骤及一切凋亡信号传导的共同通路。caspase-3 的表达不仅反映细胞的凋亡水平,而且反映凋亡启动因素的存在。本研究通过对荷瘤裸鼠采用不同的干预方式,发现用药组 caspase-3 的表达都有不同程度增高,提示氟尿嘧啶制剂能启动肿瘤细胞的凋亡程序,从而发挥抗肿瘤作用,这与张弦等<sup>[10]</sup>的研究一致。同时氟尿嘧啶缓释剂组表现出更高的 caspase-3 表达,这跟其能够达到更高的药物浓度是分不开的,提示其促凋亡作用呈现剂量相关性,这与符立平等<sup>[11]</sup>研究的结果在一定程度上是一致的。

综上所述,氟尿嘧啶缓释剂能够更有效地诱导肿瘤细胞的凋亡而发挥抗肿瘤作用,进而抑制肿瘤的生长,且能减少肿瘤细胞异型性的发生,其在抗肿瘤方面呈现剂量相关性。氟尿嘧啶缓释剂植入后能够在局部达到较高的药物浓度,所以其抗肿瘤效果明显优于传统方式,且其作用持久,值得在临床作为结直肠癌的化疗药物推广。

#### 参考文献:

[1] 马晓聪,李弘,颜丽萍,等. 氟尿嘧啶植入剂治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 医学综述,2012,18(5):1475-1477.

[2] 黄展宝,颜丽萍,李弘,等. 氟尿嘧啶缓释剂对人结肠癌裸鼠促肿瘤凋亡的机制研究[J]. 安徽医科大学学报,2013,48(2):107-110.

[3] 李昌立. 氟尿嘧啶植入剂用于消化道恶性肿瘤手术患者效果观察[J]. 山东医药,2012,52(35):59-60.

[4] Hyodo I,Suzuki H,Takahashi K, et al. Present status and perspectives of colorectal cancer in Asia:colorectal cancer working group report in 30th Asia-Pacific cancer conference[J]. Jpn J Clin Onco,2010,40(Suppl 1):38-43.

[5] 庞文广,叶敏,伍硕允,等. 缓释氟尿嘧啶术中植入治疗食管癌的临床研究[J]. 海南医学,2010,21(20):22-23.

[6] 戚国成,曹东,代果. 结肠癌患者术中植入缓释型氟尿嘧啶的临床评估[J]. 现代医药卫生,2011,27(14):2101-2103.

[7] 于洋,闫肃,于艳波. 术中局部植入氟尿嘧啶缓释剂在胃肠道肿瘤化疗中的应用研究[J]. 中国实用医药,2011,6(8):149-150.

[8] 储成顶,储梦媛,刘飞. 局部给药长效缓释的剂代模型初探[J]. 安徽医药,2006,10(2):90-92.

[9] Wang J,Lenardo MJ. Roles of caspase in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies[J]. Cell Sci,2000,113(5):753-757.

[10] 张弦,陈明净,陈宣世,等. survivin 和 caspase3 蛋白在大肠黏膜癌变过程中的表达及意义[J]. 海南医学,2009,20(9):1-4.

[11] 符立平,周燕,刘华文,等. 中人氟安对人肝癌裸鼠异位移植瘤生长的抑制作用[J]. 泸州医学院学报,2012,35(2):157-161.

(收稿日期:2013-03-08 修回日期:2013-05-23)

(上接第 3083 页)

secretion[J]. Blood Cancer J,2011,1(6):27-35.

[10] Engelhardt M,Kleber M,Udi J, et al. Current approaches in multiple myeloma and other cancer-related bone diseases[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2012, 137(20):1057-1061.

[11] Vallet S,Pozzi S,Patel K, et al. A novel role for CCL3 (MIP-1a) in myeloma-induced bone disease via osteocalcin downregulation and inhibition of osteoblast function[J]. Leukemia,2011,25(7),1174-1181.

[12] Gkatzamanidou M,Dimopoulos MA,Kastritis E, et al. Sclerostin;a possible target for the management of cancer-induced bone disease[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012,16(8):761-769.

[13] Voskaridou E,Christoulas D,Plata E, et al. High circulat-

ing sclerostin is present in patients with thalassemia-associated osteoporosis and correlates with bone mineral density[J]. Horm Metab Res,2012,44(12):909-913.

[14] Terpos E,Fragiadaki K,Konsta M, et al. Early effects of IL-6 receptor inhibition on bone homeostasis;a pilot study in women with rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol,2011,29(6):921-925.

[15] Terpos E,Christoulas D,Katodritou E, et al. Elevated circulating sclerostin correlates with advanced disease features and abnormal bone remodeling in symptomatic myeloma: reduction post-bortezomib monotherapy[J]. Int J Cancer,2012,131(6):1466-1471.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-03-22)