

·论 著·

5-氟尿嘧啶腹腔内缓释化疗对 H22 腹水瘤小鼠的抑瘤疗效观察

姜福全,王 强*,蔡清萍,杨伟志(第二军医大学长征医院普通外科,上海 200003)

[摘要] 目的:观察 5-氟尿嘧啶(5-FU)腹腔内缓释化疗对 H22 腹水瘤小鼠的抑瘤作用。方法:昆明种实验小鼠腹腔内注射 0.2 ml H22 腹水瘤细胞悬液(含癌细胞 4×10^6)制备腹水瘤小鼠模型。成模小鼠分为生理盐水对照组、腹腔化疗组、缓释化疗组和缓释对照组 4 组,分别给予腹腔注射生理盐水、普通 5-FU、5-FU 缓释剂以及缓释对照品。观察各组小鼠的生存期;流式细胞仪测定腹腔注射后第 9、12 天各组小鼠腹水瘤细胞的凋亡率,计算增殖指数;腹腔注射后第 12 天电镜观察各组腹水瘤细胞涂片。结果:腹腔化疗组小鼠平均生存期低于缓释化疗组[(13.7 \pm 1.7) d vs (15.3 \pm 2.0) d, $P < 0.05$],但均明显高于生理盐水对照组和缓释对照组($P < 0.05$),而后两者无显著差异。实验第 9 天,腹腔化疗组小鼠腹水瘤细胞的凋亡率(%)明显高于缓释化疗组(16.5 \pm 1.7 vs 8.1 \pm 0.9, $P < 0.05$),而第 12 天缓释化疗组明显高于腹腔化疗组(10.1 \pm 1.3 vs 7.6 \pm 0.8, $P < 0.05$)。实验第 9、12 天,腹腔化疗组和缓释化疗组瘤细胞凋亡率均明显高于生理盐水对照组和缓释对照组($P < 0.05$),后两者无显著差异。电镜观察结果显示腹腔化疗组和缓释化疗组腹水瘤细胞呈典型的凋亡形态学变化,而对照组瘤细胞形态无明显变化。结论:5-FU 腹腔缓释化疗较腹腔化疗延长了荷瘤小鼠的生存期,对腹腔内肿瘤细胞的抑制作用较持久。

[关键词] 肿瘤治疗方案;氟尿嘧啶;注射,腹腔内;药物疗法;迟效制剂

[中图分类号] [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)11-1207-03

Efficacy of intraperitoneal sustained-release chemotherapy with 5-FU on mice bearing H22 ascitic tumor

JIANG Fu-quan, WANG Qiang*, CAI Qing-ping, YANG Wei-zhi (Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the inhibitory effect of intraperitoneal sustained-release chemotherapy with 5-FU on the growth of H22 ascitic tumor in mice. **Methods:** Mouse H22 ascitic tumor model was established by intraperitoneal injection of 0.2 ml H22 ascitic cells (4×10^6 cells) and the animals were subsequently divided into 4 groups randomly, namely, the saline control group (received saline), peritoneal chemotherapy group (received common 5-FU), sustained-release chemotherapy group (received sustained-release 5-FU), and negative control group (received control sustained-release agent). The survival times of the mice were recorded in all groups. The apoptosis rates of H22 ascitic cells were analyzed with flow cytometry 9 and 12 days after injection of H22 cells and the proliferation index was calculated. Electron microscope was used to observe H22 cells 12 days after peritoneal injection. **Results:** The average survival time of peritoneal chemotherapy group ([13.7 \pm 1.7] d) was significantly shorter than that of sustained-release chemotherapy group ([15.3 \pm 2.0] d) ($P < 0.05$), but was longer than those of saline control group and negative control group ($P < 0.05$), with no significant difference between the latter 2 groups. The apoptosis rate of H22 cells in sustained-release chemotherapy group was lower than that in peritoneal chemotherapy group (8.1 \pm 0.9 vs 16.5 \pm 1.7, $P < 0.05$) 9 days after injection of H22 cells, but was higher than the latter 12 days after injection (10.1 \pm 1.3 vs 7.6 \pm 0.8, $P < 0.05$); besides, they were both higher than those of saline control and negative control groups ($P < 0.05$), with no significant difference found between the latter 2. Electron microscopic results showed that some H22 cells in peritoneal chemotherapy group and sustained-release chemotherapy group had a typical apoptosis appearance, and most cells in control group remained unchanged. **Conclusion:** Intraperitoneal sustained-release chemotherapy using 5-FU can prolong the survival time of mice bearing tumors and can inhibit the growth of H22 ascitic tumors for a longer period of time.

[KEY WORDS] antineoplastic protocols; fluorouracil; injections, intraperitoneal; drug therapy; delayed action-preparations

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11):1207-1209]

“腹腔内化疗”的概念是由美国癌症协会经过一系列研究于 1970 年提出的,最初是应用小剂量化疗液腹腔内注射控制卵巢癌患者的腹水^[1],后广泛用于多种腹腔内肿瘤的治疗。其应用的药物主要有 5-氟尿嘧啶(5-FU)、氨甲蝶呤、丝裂霉素等,其中以 5-FU 较为常见^[2]。本实验中以荷 H22 腹水瘤小鼠为模型,探讨腹腔内缓释化疗的抑瘤作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂 82 只雌性昆明种小鼠由第

[作者简介] 姜福全,博士。现在解放军第 306 医院普通外科,北京 100075。E-mail:herojq@hotmail.com

*Corresponding author. E-mail:wang2929@hotmail.com

二军医大学实验动物中心提供,6周龄,体质量18~20g,SPF级动物实验室条件下饲养。5-FU缓释剂(sustained released fluorouracil):由芜湖中人药业有限责任公司提供,国药准字H20030345,含有效成分FU约2mg/粒。5-FU:250mg/支,上海海普制药厂,购自长征医院药房。5-FU缓释剂对照品,由芜湖中人药业有限责任公司提供。

1.2 昆明种小鼠 H22 腹水瘤模型的建立

1.2.1 癌细胞悬液的制备

腹腔穿刺抽取 H22 腹水瘤模型鼠(由中国医学科学院上海肿瘤研究所提供)腹水,加入适量生理盐水,配成细胞悬液,细胞计数及测定细胞活力,活细胞率达95%。调整细胞密度为 2×10^7 /ml备用。

1.2.2 昆明种小鼠腹腔种植

记录每只昆明种实验小鼠的质量后,用70%乙醇腹部消毒,每只小鼠腹腔注入0.2ml H22 腹水瘤细胞悬液(含癌细胞 4×10^6 个)。

1.3 腹腔化疗

腹腔注射后第4天,随机将腹腔接种后的小鼠分为4组,生理盐水对照组(20只):腹腔穿刺注射生理盐水0.2ml,1次/d,4~8d;腹腔化疗组(22只):腹腔穿刺注射5-FU 20mg/kg,0.2ml,1次/d,4~8d;缓释化疗组(22只):第4天腹腔穿刺注射5-FU缓释剂(含5-FU 100mg/kg)+生理盐水0.2ml,第5~8d腹腔穿刺注射生理盐水0.2ml,1次/d;缓释对照组(18只):第4天腹腔穿刺注射缓释剂对照品+生理盐水0.2ml,第5~8天腹腔穿刺注射生理盐水0.2ml,1次/d。

1.4 观察指标

1.4.1 各组小鼠的生存期比较

计算各组实验小鼠的平均生存期,以及相对于生理盐水对照组小鼠其他各组小鼠的生命延长率(%)=(其他各组小鼠平均生存时间-生理盐水对照组平均生存时间)/生理盐水对照组平均生存时间 $\times 100\%$ 。各组小鼠观察的数量分别为生理盐水对照组8只,腹腔化疗组10只,缓释化疗组10只,缓释对照组6只。

1.4.2 腹水瘤细胞凋亡率、增殖指数的计算以及电镜观察

实验第9天用脱颈椎法处死各组小鼠各6只,腹部穿刺抽取腹水,用流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率,计算增殖指数 $= (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + G_2/M + S)$ 。实验第12天处死各组剩余小鼠(其中对照组和缓释对照组各有5只,腹腔组和缓释组各6只),计算细胞凋亡率和增殖指数,并行电镜观察。

1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用方差分析。

2 结果

2.1 腹腔缓释化疗对 H22 腹水瘤小鼠生存期的影

响 生理盐水对照组,腹腔化疗组,缓释化疗组及缓释对照组小鼠的生存期(d)分别为 12.0 ± 1.5 、 13.7 ± 1.7 、 15.3 ± 2.0 和 12.7 ± 1.4 。与生理盐水对照组相比,腹腔化疗组和缓释化疗组小鼠的生存期明显延长($P < 0.05$),分别延长了14.2%和27.5%。缓释化疗组明显长于腹腔化疗组($P < 0.05$)。而生理盐水对照组和缓释对照组之间无明显差异。

2.2 腹腔缓释化疗对 H22 腹水瘤细胞凋亡率和增殖指数的影响

实验第9天时腹腔化疗组和缓释化疗组腹水瘤细胞周期发生明显变化, G_0/G_1 期细胞相对增加,而S期和 G_2/M 期细胞相对减少。与生理盐水对照组(0.47)相比,腹腔化疗组腹水细胞的增殖指数(0.30)明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);缓释化疗组(0.37)与生理盐水对照组相比差异也有统计学意义($P < 0.05$),缓释化疗组明显高于腹腔化疗组($P < 0.05$);而生理盐水对照组与缓释对照组(0.46)之间无明显差异。在实验第12天时腹腔化疗组腹水细胞的增殖指数为0.38,与生理盐水对照组(0.39)无明显差别;而缓释化疗组腹水细胞的增殖指数为0.32,与生理盐水对照组差异仍有统计学意义($P < 0.05$);而生理盐水对照组与缓释对照组(0.39)之间无明显差异。

实验第9天时,腹腔化疗组腹水瘤细胞的凋亡率为 $(16.5 \pm 1.7)\%$,缓释化疗组为 $(8.1 \pm 0.9)\%$,明显高于生理盐水对照组 $(2.4 \pm 0.4)\%$ 和缓释对照组 $(2.5 \pm 0.3)\%$ (P 均 < 0.05);腹腔化疗组高于缓释化疗组($P < 0.05$)。实验第12天时,腹腔化疗组的细胞凋亡率为 $(7.6 \pm 0.8)\%$,缓释化疗组的细胞凋亡率为 $(10.1 \pm 1.3)\%$,与生理盐水对照组 $(5.3 \pm 0.5)\%$ 相比,仍有明显的差异(P 均 < 0.05),且缓释化疗组的细胞凋亡率较腹腔化疗组高($P < 0.05$),而生理盐水对照组与腹腔缓释对照组 $(4.8 \pm 0.7)\%$ 之间无明显差异。

2.3 小鼠腹水细胞涂片的电镜观察

实验第12天时发现生理盐水对照组腹水瘤细胞数多,细胞核大且成团聚集深染,缓释对照组与其相似。腹腔化疗组和缓释化疗组瘤细胞数量明显减少,有较多细胞呈坏死性改变,胞质崩裂,核消失;而且有较多呈典型的凋亡形态学变化:细胞核内染色质浓缩聚集,呈团块状或花瓣状,位于核膜内侧;核中央可见低电子密度的染色质,部分细胞可见核膜破裂,胞核崩解,形成早期凋亡小体;胞质内线粒体轻微肿胀,部分空泡样变,其他细胞器结构基本正常(图1)。

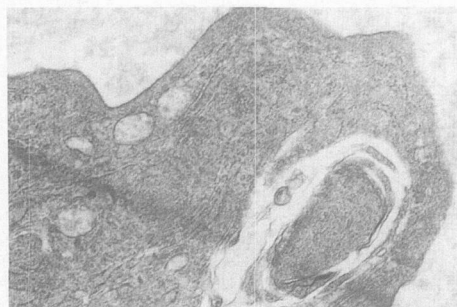


图 1 腹水细胞凋亡的电镜照片
Fig 1 Apoptosis of H22 cells under
electron microscope($\times 10\ 000$)

3 讨论

腹腔内化疗从 20 世纪 70 年代开始应用于临床, 目前已经成为消化道肿瘤术后预防复发和转移的重要手段之一。以往研究^[3,4]表明某些抗肿瘤药物经腹腔直接注入, 腹腔内容物所接触的浓度大大高于血浆药物浓度, 用药数小时后腹腔内浓度约是体循环血浆浓度的 400 ~ 1 000 倍, 而门静脉的药物浓度也几乎是体循环血浓度的 4 倍。相对于传统的全身化疗, 腹腔化疗具备以下优点: 高浓度的抗癌药物直接作用于肿瘤细胞, 增强了杀伤能力; 抗癌药物经门静脉入肝可以增强对肝脏转移瘤的治疗效果; 腹腔内化疗可以降低胃肠道肿瘤术后复发和肝脏转移; 减少体循环的毒性, 产生最大限度药物剂量耐受性^[5]。但是, 研究^[6]发现大剂量 5-FU (100 mg/kg) 腹腔化疗后腹腔内 5-FU 的半衰期在 3.8 h 左右, 时间较短。因此, 有必要采用一种新的化疗手段, 在保留腹腔化疗优势的基础上, 进一步延长药物的作用时间。罗学来等^[7]发现将 5-FU 加入活性炭后行腹腔化疗可以更进一步增加药物的作用时间, 但并未进一步深入研究。梁寒等^[8]研究发现利用活性炭吸附丝裂霉素后腹腔内注射, 在腹腔液、大网膜和淋巴结形成高药物浓度, 并维持 24 h 以上, 而丝裂霉素水剂腹腔化疗则不能在血浆、大网膜和淋巴结形成高药物浓度。

本实验我们使用 5-FU 缓释剂进行化疗, 并观察其疗效。此 5-FU 缓释剂是应用高分子骨架及膜层技术来控制氟尿嘧啶, 植入体内后, 体液逐层渗入药粒, 微囊之间的药物以较快速度释放, 在短时间内于植药区域形成一个冲击浓度; 同时体液逐层渗入到药物微囊内, 溶解囊内药物, 在浓度梯度的作用下药物向膜外扩散(即渗透-扩散机制), 形成较稳定的

释放速度。

研究结果表明 5-FU 腹腔内缓释化疗抑制了腹水瘤细胞的增殖, 延长了小鼠的生存期。与腹腔化疗相比, 腹腔内缓释化疗对荷瘤小鼠生存期的延长作用更明显。有研究^[9]发现 5-FU 佐剂包裹物可明显延长小鼠的生存期, 而 5-FU 无明显效果。上述实验中的佐剂正是起到缓慢释放和促进机体免疫反应的作用。

我们又对比研究了各组实验小鼠腹水细胞的增殖指数和凋亡率。结果提示腹腔化疗组药物对肿瘤细胞增殖的抑制作用明显, 但作用持续时间短; 缓释化疗组药物作用时间长, 在给药后 8 d 仍对腹腔内的肿瘤细胞增殖有抑制作用。而各组腹水细胞凋亡比例的变化也体现了类似的趋势。以上结果符合 5-FU 作用的细胞周期特异性规律, 仅对增殖细胞尤其 S 期作用较好, 且延缓 G₁ 期向 S 期的进展, 具有自限性。这表明腹腔内缓释化疗在更长时间内抑制了肿瘤细胞的增殖, 促进其凋亡。

综上所述, 本研究用腹水瘤小鼠模拟了腹腔内肿瘤复发或种植的临床现象, 对比了 5-FU 腹腔化疗和腹腔缓释化疗的疗效, 结果证实腹腔缓释化疗在更长的时间里诱导小鼠腹水瘤细胞凋亡, 抑制其增殖, 延长了动物的存活时间, 这为临床预防和治疗腹腔内恶性肿瘤术后复发提供较好的用药方式。

[参考文献]

- [1] Myers CE. The clinical setting and pharmacology of intraperitoneal chemotherapy: an overview[J]. *Semin Oncol*, 1985, 12 (3 Suppl 4): 12-16.
- [2] Stewart JH 4th, Shen P, Levine EA. Intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal surface malignancy: current status and future directions[J]. *Ann Surg Oncol*, 2005, 12: 765-777.
- [3] Kuzuya T, Yamauchi M, Ito A, et al. Pharmacokinetic characteristics of 5-fluorouracil and mitomycin C in intraperitoneal chemotherapy[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1994, 46: 685-689.
- [4] Gyves J. Pharmacology of intraperitoneal infusion 5-fluorouracil and mitomycin-C [J]. *Semin Oncol*, 1985, 12 (3 Suppl 4): 29-32.
- [5] Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 330-338.
- [6] 韩晓燕, 卫洪波, 连建学, 等. 5-氟尿嘧啶不同给药途径的药代动力学研究和临床应用[J]. *中国新药杂志*, 1999, 8: 20-23.
- [7] 罗学来, 杨传永, 曾凡波, 等. 5-氟尿嘧啶不同容量腹腔化疗的药代动力学及活性炭应用对其的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21: 33-34.
- [8] 梁寒, 唐贺文, 郝希山, 等. 活性炭吸附丝裂霉素 C 腹腔化疗的药代动力学研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27: 412-415.
- [9] 刘松青, 黄晋生, 马文秀, 等. 5-FU 福氏佐剂包裹物抗肿瘤作用的实验研究[J]. *中国药房*, 1995, 6: 11-13.

[收稿日期] 2006-04-18

[修回日期] 2006-10-12

[本文编辑] 贾泽军