

4 参考文献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expression in cancer and lymphoma. *Nature Med* 1997;3:917-921
- 2 高虎, 赵治华, 杨峰. 三氧化二砷诱导细胞凋亡治疗消化道肿瘤的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:710-711
- 3 Xia C, Xu Z, Yuan X, Uematsu K, You L, Li K, Li L, McCormick F, Jablons DM. Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides. *Mol Cancer Ther* 2002;1:687-694
- 4 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术. 第一版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997:447-448
- 5 Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998;152:43-19
- 6 Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-584
- 7 Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 (INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000;19:3225-3234
- 8 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320
- 9 Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:1080-1085
- 10 Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001;40:1117-1123
- 11 Yang JH, Zhang YC, Qian HQ. Survivin antisense oligodeoxynucleotide inhibits growth of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1121-1124
- 12 Cheng SQ, Wang WL, Yan W, Li QL, Wang L, Wang WY. Knockdown of survivin gene expression by RNAi induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *World J Gastroenterol* 2005;11:756-759
- 13 王亚利, 宋天保, 王西京, 王中卫, 宋淮, 郝小静. Survivin mRNA 反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2004;12:1872-1874
- 14 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- 15 林晨, 邓友平, 郑杰, 付明, 陈洁平, 肖培根, 吴旻. 三氧化二砷诱导人肿瘤细胞凋亡和 G2+M 期阻滞但引起人永生化宫颈上皮细胞 G1 期阻滞. *中国医学科学院学报* 2000;22:124-129

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗预防大肠癌术后肝转移的实验

杜卫东, 袁祖荣, 沈达明, 乔伟伟, 黄春锦, 唐健雄, 程爱群, 张赣生, 王一倩, 于晓峰, 竺越

杜卫东, 袁祖荣, 沈达明, 黄春锦, 唐健雄, 程爱群, 上海市华东医院普外科 上海市 200040

乔伟伟, 复旦大学动物实验部 上海市 200032

张赣生, 王一倩, 于晓峰, 竺越, 上海市华东医院消化科 上海市 200040

通讯作者: 杜卫东, 200040, 上海市华东医院普外科.

收稿日期: 2005-03-12 接受日期: 2005-04-20

摘要

目的: 观察血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗对预防大肠癌术后肝转移的作用。

方法: RT-PCR 克隆血管抑素基因, 建立重组腺病毒载体. 建立人结肠癌 LoVo 肝转移种植模型, 给予血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗. 观察其对大肠癌细胞肝转移的影响。

结果: 血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗治疗组肝转移发生率明显低于其他各组($P < 0.05$), 肝转移瘤数少于其他各组($P < 0.05$), 荷瘤生存时间长, 治疗组肿瘤组织中血管抑素基因表达为阳性, MVD 明显低于其他各组。

结论: 血管抑素的基因治疗与传统的腹腔化疗联合应用, 对预防裸鼠人 LoVo 结肠癌细胞肝转移有一定的作用。

杜卫东, 袁祖荣, 沈达明, 乔伟伟, 黄春锦, 唐健雄, 程爱群, 张赣生, 王一倩, 于晓峰, 竺越. 血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗预防大肠癌术后肝转移的实验. *世界华人消化杂志* 2005;13(12):1449-1451
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1449.asp>

0 引言

大肠癌术后肝转移的发生率甚高^[1], 大剂量腹腔化疗对防治术后肝转移有重要的临床意义^[2]. 我们用裸鼠人 LoVo 结肠癌肝转移模型, 观察血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗对预防大肠癌术后肝转移的作用, 为血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗在大肠癌患者的应用提供理论和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶、M-MLV 逆

转录酶等均购自华美公司。pJM17 质粒、腺病毒 LacZ、人胚肾 293 等购自中科院细胞所。人结肠癌 LoVo 细胞由中科院上海药物所提供。Balb/c nu/nu 裸鼠 48 只 (SPF 级), 4-6 周龄, 体重 18-20 g, 雌雄兼有, 购自中科院实验动物中心, 饲养于上海复旦大学附属医学院实验动物部, 裸鼠置于恒温层流箱中, 于无特定病原体 (SPF) 环境下饲养。12 h 光照和 12 h 黑夜交替。喂养符合卫生部颁布的“医学实验动物全价营养饲料标准”。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人结肠癌 LoVo 细胞、293 细胞、ECV304 细胞于高糖 DMEM 培养基, 常规添加 100 mL/L 小牛血清, 青霉素 100 mg/L, 链霉素 100 mg/L, 50 mg/L CO₂ 37℃ 恒温半封闭培养。

1.2.2 RT-PCR 克隆血管抑素基因 一步法提取人肝脏组织 RNA。设计针对血管抑素 Angiostatin 信号肽及编码区的引物: 引物 1: 5' -AGCGAATTCCAAATGGAACATAAGG-3'; 引物 2: 5' - AGCCTCGACCTATTACGCTTCTGTTCTGAC-3', 分别在两条引物中设计了 *EcoRI* 和 *XhoI* 限制内切酶的点位, 常规进行 RT-PCR, PCR 产物回收纯化后, 用 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切, 克隆 pcDNA3 质粒相应酶切位点, 命名为 pcDNA3 (AGS), 测序鉴定。

1.2.3 重组腺病毒载体的构建 将 angiostatin 基因 pcDNA3 (AGS) 克隆至 pAdCMV, 形成 pAdCMV (AGS) 再与 Pjml7 质粒采用磷酸钙沉淀法共转染 293 细胞, 挑取病毒噬斑, 得到 pAdCMV-AGS, 扩增, 氯化铯梯度离心纯化, 滴度测定。按同样法构建无基因携带的空病毒载体 Ad-nu11 做对照。病毒转染效率实验和细胞体内增殖实验: 由 Ad-LacZ 做腺病毒载体转染标记, MTT 法测定其感染 ECV304 细胞和 LoVo 细胞的比率。

1.2.4 预防人结肠癌 LoVo 细胞 (HCC) 肝转移的实验 Balb/c nu/nu 裸鼠 48 只, 按裸鼠结肠癌 LoVo 细胞肝转移模型建立方法, 于脾脏上极注入 HCC 细胞 0.03 mL (1×10^6 /L), 随机分成 6 组, 每组 8 只, A 组对照组 (生理盐水 (NS) 40 mL/kg); B 组 5-FU 组 (5-FU 40 mg/NS 40 mL/kg); C 组 AdCMV-AGS 组 (CMV 10 μ L/NS 40 mL/kg, 即 10^{11} pfu/L); D 组 Ad-nu11 组 (CMV 10 μ L/NS 40 mL/kg); E 组 AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 1 (CMV 10 μ L 和 5-FU 40 mg/NS 40 mL/kg); F 组 AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 2

(5-FU 40 mg/NS 40 mL/kg, 7 d 后腹腔内注射 AdCMV-AGS, CMV 10 μ L)。所有裸鼠于自然死亡或存活 60 d 后处死, 剖腹观察腹腔内情况, 作肝脏表面肿瘤肉眼计数, 病理检查。观察各组裸鼠荷瘤生存时间、肝转移的发生率、肝转移瘤数, RT-PCR 检测血管抑素基因的表达, 免疫组化法检测肿瘤微血管密度 (MVD)。其中荷瘤生存时间大于 60 d, 计为 60 d; 肝转移瘤数大于 100 个, 计为 100。

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 用 SPSS10.0 统计软件处理, 数据比较采用一般线性模型进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T-PCR 克隆血管抑素基因 RT-PCR 从肝脏组织中扩增 1.1 kb 的基因片段, 克隆 AGS (pcDNA3), 测序结果同以往文献相同相当于纤溶酶原 Kringle-Kringle4 的编码区域。

2.2 重组腺病毒载体的构建 将 angiostatin 基因 pcDNA3 (AGS) 克隆至 pAdCMV, 形成 pAdCMV (AGS) 再与 pjm17 质粒采用磷酸钙沉淀法共转染 293 细胞, 挑取病毒噬斑, 得到 pAdCMV-AGS, PCR 鉴定有 Angiostatin 基因存在扩增, 氯化铯梯度离心纯化, 测定病毒滴度为 10^{13} pfu/L。按同样方法构建无基因携带的空病毒载体 Ad-nu11 做对照。病毒转染效率实验和细胞体内增殖实验: 由 Ad-LacZ 做腺病毒载体转染标记, MTT 法测定其感染 ECV304 细胞和 LoVo 细胞的比率为 100%。

2.3 预防人结肠癌 LoVo 细胞肝转移的实验 (表 1) AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 1 在接种后肝转移发生率明显低于其他各组 ($P < 0.05$), 而 5-FU 组和 AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 2 的接种后肝转移发生率明显低于对照组、AdCMV-AGS 组和 Ad-nu11 组 ($P < 0.05$)。AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 1 在接种后肝转移瘤数为 23.1 ± 4.7 , 显著低于其他各组 ($P < 0.05$), 而 5-FU 组和 AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 2 的接种后肝转移瘤数低于对照组、AdCMV-AGS 组和 Ad-nu11 组 ($P < 0.05$)。AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 1 在接种后荷瘤生存时间为 47.4 ± 8.1 d, 显著高于其他各组 ($P < 0.05$), 而 5-FU 组和 AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 2 的接种后荷瘤生存时间高于对照组、AdCMV-AGS 组和 Ad-nu11 组 ($P < 0.05$)。

RT-PCR 检测显示 AdCMV-AGS 组和两组 AdCMV-AGS 联合 5-FU 治疗组的肿瘤组织中血管基因表达皆为阳性。免

表 1 预防人结肠癌 LoVo 细胞肝转移的实验结果 (mean \pm SD)

组别	肝转移发生率 %	肝转移瘤数	荷瘤生存时间 (d)	MVD
A: 对照组	100% (8/8)	50.3 ± 7.5	31.8 ± 5.2	6.21 ± 0.91
B: 5-FU 组	75% (6/8)	39.0 ± 5.8	43.5 ± 7.3	5.66 ± 0.68
C: AdCMV-AGS 组	87.5% (7/8)	49.6 ± 7.3	32.3 ± 4.6	4.34 ± 0.64
D: Ad-nu11 组	100% (8/8)	47.8 ± 5.4	34.0 ± 7.3	6.49 ± 0.82
E: AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 1	50% (4/8)	23.1 ± 4.7	47.4 ± 8.1	3.93 ± 0.70
F: AdCMV-AGS 联合 5-FU 组 2	75% (6/8)	36.5 ± 6.2	32.4 ± 6.4	4.15 ± 0.87

疫组化检查结果显示两组AdCMV-AGS联合5-FU治疗组肿瘤组织中微血管记数(MVD)明显低于其他各组,其差异有统计学意义($P < 0.05$).

3 讨论

血管抑素具有专一靶细胞,即血管内皮细胞.正常成人的血管内皮细胞只有0.01%进行细胞分裂,而肿瘤病灶中进行细胞分裂的内皮细胞可达到正常组织的100-1 000倍^[3].因此,血管抑素通过作用于肿瘤血管内皮细胞发挥其强大的抑制肿瘤血管生长的同时对正常组织血管内皮细胞则损伤很小,是一种高效低毒肿瘤血管抑制剂.

目前认为血管抑素抑制肿瘤血管生成的作用机制可能与以下几个方面有关:(1)增强黏附激酶的活性,促进内皮细胞的凋亡^[4];(2)诱导蛋白激酶ERK-1和ERK-2脱磷酸化,降低其生物活性,从而抑制内皮细胞的增生^[5];(3)拮抗碱性成纤维细胞生长因子和血管内皮细胞生长因子的作用,抑制血管内皮细胞的迁移和毛细血管芽生^[6];(4)与机体内组织纤溶酶原激活物(tPA)非竞争性结合,减少tPA与纤溶酶原、细胞外基质的结合,减少纤溶酶生成,从而抑制血管内皮细胞的迁移和毛细血管芽生^[7].

目前动物实验已证实血管抑素对多种肿瘤的生长和转移具有很强的抑制作用,可抑制乳腺癌、结肠癌、前列腺癌和恶性胶质瘤等多种肿瘤的形成、增殖和转移,促使肿瘤细胞的凋亡,具有很高的临床应用价值.近年来,已有许多种血管抑素制剂进入I期和II期临床实验,并取得了良好效果.由于血管抑素在体内代谢快、停用后肿瘤会很快继续生长,与基因治疗相结合有望解决这一难题.已有学者将血管抑素基因通过脂质体或逆转录病毒载体系统转入机体或肿瘤组织,并在机体中检测到高水平的血管抑素,抑制了肿瘤的生长和转移^[8].血管抑素的基因治疗与免疫治疗、放疗、化疗联合作用可产生更强的抑瘤效果.很多研究结果提示血管抑素的基因治疗与传统的抗肿瘤细胞治疗的联合应用,能更有效地治疗肿瘤,为实体肿瘤的“双靶向”治疗奠定了实验基础^[9].

大肠癌行根治性手术后有较高的复发率^[1],一般认为肿瘤侵出浆膜层种植于腹腔或手术致癌细胞脱落入腹腔而形成亚临床种植转移,或经门脉系统而形成的肝转移^[10],以及患者手术后免疫功能的低下等因素是复发的主要原因.术后化疗对降低术后的复发率,延长生存时间有一定的疗效.

大剂量腹腔化疗对防治腹腔转移和肝转移的有重要的临床意义^[2].目前认为腹腔化疗有以下几方面的优势:(1)腹腔内局部药物浓度高^[11].(2)化疗药物通过门静脉系统吸收入肝脏,对经门静脉系统转移的癌栓及肝内转移性癌细胞有较强的杀灭作用,可预防和治疗肝转移癌,是降低胃肠道肿瘤术后肝转移的重要措施.(3)全身的毒副作用

用小^[12].(4)腹腔化疗操作技术简单,应用方便^[13].我院从1990年开始对进展期胃肠道肿瘤患者术后施行腹腔化疗.通过对我院1992年以来胃肠道恶性肿瘤术后进行经埋入式化疗泵腹腔化疗的826例患者进行回顾性分析研究,认为经皮下埋藏埋入式化疗泵腹腔化疗,操作简便,是理想的腹腔化疗方式^[14].

我们对血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗预防大肠癌术后肝转移进行实验研究,即用裸鼠人LoVo结肠癌细胞肝转移模型,观察血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗对预防大肠癌术后肝转移的作用.结果显示血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗组裸鼠的荷瘤生存期较长,肝转移发生率低,肝转移瘤的数目也较少,对预防裸鼠人LoVo结肠癌细胞肝转移有一定的作用.

4 参考文献

- 1 Yu W, Whang I, Chung HY, Averbach A, Sugarbaker PH. Indications for early postoperative intraperitoneal chemotherapy of advanced gastric cancer: results of a prospective randomized trial. *World J Surg* 2001;25:985-990
- 2 杜卫东,袁祖荣,唐建雄,沈达明,程爱群,于晓峰,钱敏,竺越.进展期胃肠道肿瘤术后联合化疗的临床疗效观察. *外科理论与实践* 2003;8:383-386
- 3 Scoff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:97-107
- 4 Plank MJ, Sleeman BD. A reinforced random walk model of tumour angiogenesis and anti-angiogenic strategies. *Math Med Biol* 2003;20:135-181
- 5 Kirsch M, Santarius T, Black PM, Schackert G. Therapeutic anti-angiogenesis for malignant brain tumors. *Oncologie* 2001;24:423-430
- 6 Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with intergrin $\alpha(V)\beta 3$ in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:39562-39568
- 7 Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol* 2002;21:33-49
- 8 Tanaka T, Cao Y, Folkman J, Fine HA. Viral vector-targeted anti-angiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res* 1998;58:3362-3369
- 9 Griscelli F, Li H, Cheong C, Opolon P, Bennaceur-Griscelli A, Vassal G, Soria J, Soria C, Lu H, Perricaudet M, Yeh P. Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6698-6703
- 10 Ragnhammar P, Hafstrom L, Nygren P, Glimelius B; SBU-group. Swedish Council of Technology Assessment in Health Care. A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer. *Acta Oncol* 2001;40:282-308
- 11 Pestieau SR, Schnake KJ, Stuart OA, Sugarbaker PH. Impact of carrier solutions on pharmacokinetics of intraperitoneal chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:269-276
- 12 Valentini V, Mantini G, Turriziani A, Balducci M, Trodella L. Research trends in the treatment of colorectal cancer. *Rays* 2000;25:393-395
- 13 Elias D, Antoun S, Goharin A, Otmany AE, Puizillout JM, Lasser P. Research on the best chemohyperthermia technique of treatment of peritoneal carcinomatosis after complete resection. *Int J Surg Investig* 2000;1:431-439
- 14 杜卫东,唐建雄,袁祖荣,曹英鸣,沈达明,程爱群,项平,竺越.老年进展期胃肠道肿瘤术后腹腔化疗的临床疗效观察. *中国实用外科杂志* 2003;23:725-728