

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )02-0122-04

## TNP-470 联合 5-FU 抑制结肠癌肝转移的研究

范应方<sup>1</sup>, 黄宗海<sup>1</sup>, 聂晶<sup>2</sup>, 宋慧娟<sup>1</sup>( 1. 第一军医大学珠江医院普外科, 广州 510282; 2. 江西南昌恒湖医院妇外科, 南昌 330123 )

**[ 摘要 ]** **目的:** 研究血管生成抑制剂 TNP-470 联合 5-FU 对结肠癌肝转移的抑制作用。**方法:** 将结肠癌 LOVO 细胞注入裸鼠脾脏, 建立结肠癌肝转移模型。将裸鼠随机分为联合治疗组、TNP-470 组、5-FU 组和对照组 4 组。治疗 4 周后, 处死裸鼠, 计数肝转移率和肝转移结节数。采用免疫组化 SABC 法和图像分析系统对肝转移肿瘤组织的微血管密度( MVD) 和血管内皮生长因子( VEGF) 的表达进行定量分析。**结果:** TNP-470 + 5-FU 组和 TNP-470 组与对照组比较, 肝转移率显著下降(  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  ); TNP-470 + 5-FU 组和 5-FU 组与对照组相比, VEGF 表达量明显下降(  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$  ); TNP-470 + 5-FU 组和 TNP-470 组与对照组相比, MVD 也明显下降(  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  )。**结论:** TNP-470 与 5-FU 联合应用具有协同效应, 可显著抑制结肠癌的肝转移, 为安全有效的抗肿瘤策略。

**[ 关键词 ]** TNP-470; 5-FU; 结肠癌; 肝转移

**[ 中图分类号 ]** R730.5; R735 **[ 文献标识码 ]** A

## Inhibitory Effect of Liver Metastasis of Human Colon Cancer by TNP-470 in Combination with 5-FU

FAN Ying-fang, HUANG Zong-hai, NIE Jing, SONG Hui-juan ( Department of Surgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China )

**[ Abstract ]** **Objective:** To study the effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 combination with 5-FU on liver metastasis of human colon cancer. **Methods:** Human colon cancer cell line, LOVO cells, were injected intrasplenically into BALB/c nude mice to produce diffuse liver metastases. Mice were randomly divided into four groups: TNP-470 treated group, 5-FU treated group, TNP-470 + 5-FU treated group and control group. Animals were sacrificed after 4 weeks, and their livers were processed for histological examination. Liver metastatic rate and tumor foci in liver were counted. Tumor microvessel density ( MVD ) and vascular endothelial growth factor ( VEGF ) were determined by immunohistochemistry SABC method with image analyse system. **Results:** TNP-470 in combination with 5-FU and TNP-470 alone display a significant inhibitory effect on liver metastasis compared to the control (  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  ). The expression of VEGF in the liver metastatic tumors was clearly inhibited by TNP-470 in combination with 5-FU and 5-FU alone compared to the control (  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$  ). The expression of MVD was also inhibited by TNP-470 in combination with 5-FU or TNP-470 alone compared to the control (  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  ). **Conclusion:** The angiogenesis inhibitor TNP-470 in combination with 5-FU has additive effect and inhibitory activity against liver metastasis of human colon cancer, therefore, might be a safe and effective anti-tumor strategy.

**[ Key words ]** TNP-470; 5-FU; colon cancer; liver metastasis

\* 新生血管生成( angiogenesis )是恶性肿瘤浸润和转移的重要条件, 与肿瘤的转归正相关。自 Folkman 首先提出实体瘤的生长需要血管生成的理论后, 有关血管抑制剂的研究十分活跃, 抗血管治疗也成为肿瘤生物治疗的研究热点之一。TNP-470 是目前发现的较

为有效的血管抑制剂, 通过抑制血管内皮细胞的分裂、

\* [ 基金项目 ] 广东省自然科学基金项目( 013072 )

[ 作者简介 ] 范应方( 1971- ), 男, 安徽东至人, 医师, 硕士, 主要从事胃肠道肿瘤的基因和抗血管治疗方面的研究。

增殖和迁移而抑制肿瘤新生血管生成。研究表明 TNP-470 对多种实体瘤的生长具有抑制作用。本研究采用结肠癌肝转移模型,联合 NP-470 和 5-FU 进行实验性治疗,观察联合用药对结肠癌肝转移的抑制效应,并进一步比较两者的治疗效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂和材料

雌性 4 周龄 BALB/c 裸鼠,体重 17 ~ 22 g,由第一军医大学动物实验中心提供,饲养于 SPF 环境下。结肠癌 LOVO 细胞株由本室保存。TNP-470 由日本大阪 Takeda 化学公司 Hiroshi Fukui 博士惠赠,用前取 TNP-470 30 mg 用 0.3 ml 无水乙醇溶解,再以 9.7 ml 生理盐水稀释成 3 mg/ml 备用。RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶、新生小牛血清等均购自杭州四季青生物技术有限公司。兔抗人 VEGF 免疫组化试剂盒和鼠抗人 VIII 因子抗体购自美国 SIGMA 公司,SABC 试剂盒和 DAB 试剂盒购自武汉博士德公司。

### 1.2 LOVO 细胞的培养

LOVO 细胞购自上海免疫研究所,由本室传代保存。该细胞株由美国引进,肿瘤来源于 1 例 56 岁的结肠癌患者锁骨上淋巴结手术切除标本,经体外培养建株。LOVO 细胞用 RPMI-1640 培养基置 CO<sub>2</sub> 孵箱于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养,RPMI-1640 培养基内含 10% 的小牛血清,100 U/ml 的青链霉素。

### 1.3 结肠癌肝转移模型的建立

收集培养 3 d 的 LOVO 细胞,用生理盐水调整细胞数为  $(5 \sim 10) \times 10^9 L^{-1}$ ,用于动物实验。每只裸鼠以 20 mg/ml 氯胺酮 (0.2 ~ 0.3 ml) 麻醉成功后,无菌条件下,取左腋中线与肋缘交界下切开长约 1.0 cm 横切口,进腹后找到脾脏,轻轻提出腹腔,在脾脏上极以微量注射器将 0.2 ml LOVO 细胞悬液缓慢注入脾包膜下 (1 ~ 2 min),注射完毕,以 75% 酒精棉球按压注射孔 (2 min),压迫止血和杀灭可能外渗的癌细胞,防止腹腔内种植转移。将脾脏放回原位,缝合腹部切口,送 SPF 环境下饲养。

### 1.4 治疗实验

42 只裸鼠,随机分成 4 组,各组体重间无显著性差异 ( $19.7 \pm 1.4$  g,  $20.5 \pm 0.8$  g,  $20.0 \pm 0.6$  g,  $20.2 \pm 0.8$  g,  $P > 0.05$ )。各组均于术后第 2 天给药。TNP-470 组和联合治疗组: TNP-470 30 mg/kg (0.2 ml) 隔日皮下注射;5-FU 组和联合治疗组: 5-FU 30 mg/kg 腹腔注射,连续 3 d 后间隔 4 d;对照组隔日皮下注射相同体积的 3% 的乙醇溶液,给药部位远离手术切口。观察裸鼠生活状态及体重变化情况。

### 1.5 各组肝转移率及转移结节数

4 周后处死裸鼠,剖腹观察肿瘤转移情况,作肝脏表面肿瘤结节肉眼计数和肝脏剖面光镜下计数。摘除裸鼠肝脏,用 10% 的中性甲醛固定,取 6 个肝脏冠状切面,每一切面相距 0.4 cm,以最大冠状切面为中心,在显微镜下计数,同一结节出现在不同切面上计为一个结节。取肉眼计数和显微镜计数之和为肝转移结节数目,肉眼及镜下未见转移结节的视为肝转移阴性。取肝、脾、胰、肺及可疑脏器和组织置 10% 的中性甲醛固定,石蜡包埋,组织切片 (4  $\mu$ m),行 H-E 染色及免疫组化染色。

### 1.6 各组转移瘤 VEGF 和 MVD 的表达

免疫组化采用 SABC 法。VEGF 染色判定标准:高倍镜视野下计数 100 个细胞,胞浆呈棕黄色的阳性细胞小于 5% 为阴性,大于或等于 5% 为阳性。采用德国 KONTRON IBSA 2.5 全自动图象分析系统测定肿瘤组织中 VEGF 的平均灰度和象素面积,按公式换算成阳性单位 (PU),以 PU 值定量 VEGF 的表达<sup>[1]</sup>。

MVD 计数参考 Weidner 等<sup>[2]</sup>方法。MVD 判断标准:凡与临近的肿瘤细胞、微血管或结缔组织分开的呈棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞串计为 1 个血管,但肌层较厚或管腔面积大于 8 个红细胞直径的血管不计数。

### 1.7 统计学处理

试验前各组鼠重、试验结束后改变的鼠重、VEGF 的表达及 MVD 计数用单向方差分析 (one-way-analysis),各组肝转移率的比较、不同转移结节数的裸鼠所占比例的比较用卡方检验 ( $\chi^2$ -test),数据采用 SPSS10.0 统计软件分析。

## 2 结 果

### 2.1 裸鼠生活状态和体重变化

术后 42 只裸鼠全部成活,术后第 3 天称体重,各组均有部分裸鼠体重有所下降,到术后第 7 天基本恢复到术前水平。术后第 20 天左右,对照组部分裸鼠体重下降、消瘦、行动迟缓,有 2 只甚至出现恶病质表现,分别于 24 d,27 d 死亡,另一只出现少量腹水。其余各组裸鼠饮食、活动良好,平均体重在试验结束时有微量上升。各组裸鼠试验前后体重的改变无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 各组肝转移的情况

术后 30 d 断颈处死裸鼠,解剖腹腔。有肝转移的裸鼠肝脏表面可见多发性的灰白色小结节,肝脏体积变小,质脆硬。部分肝脏表面虽未见肿瘤结节,但在冠状剖面上也可见芝麻样细小转移灶。正常肝脏颜色鲜

红,质地柔软,肉眼及显微镜下未见转移结节。各组肝转移率及转移结节数见表 1。各组转移率有显著差异 ( $P < 0.01$ )。在肝转移结节数目比较上,对照组结节

数大于 30 个时各组裸鼠所占比例有显著性差异 ( $P < 0.01$ ,见表 1)。

表 1 各组裸鼠的肝转移率及转移结节数  
Tab.1 Liver metastatic rate and metastatic foci

Groups	n	Metastatic rate	foci = 0	1 ≤ foci < 10	10 ≤ foci < 30	foci ≥ 30
Control	9	100%	0/9	0/9	2/9	7/9
5-FU	9	77.8%	2/9	2/9	3/9	2/9
TNP-470	11	45.5%	6/11	3/11	1/11	1/11
TNP-470 + 5-FU	13	23.1%	10/13	1/13	2/13	0/13

### 2.3 肝转移瘤组织中 VEGF 及 MVD 的表达

各组肝转移瘤组织中 VEGF 及 MVD 的表达(见表 2)。联合治疗组和 5-FU 组与对照组比较以及联合治疗组与单组 TNP-470 或 5-FU 组比较,VEGF 的表达均有显著差异;联合治疗组和 TNP-470 组与对照组相比以及联合治疗组和 TNP-470 组与 5-FU 组比较,MVD 均显著减少。

表 2 各组肝转移瘤组织中 VEGF 及 MVD 的表达  
Tab.2 Expression of VEGF and MVD ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	n	VEGF( PU )	MVD
Control	9	10.22 ± 2.86	23.16 ± 4.20
5-FU	7	7.29 ± 1.89 <sup>△</sup>	19.45 ± 3.47
TNP-470	5	8.80 ± 2.39	12.64 ± 4.26 <sup>◇□</sup>
TNP-470 + 5-FU	3	3.33 ± 1.53 <sup>▲■</sup>	9.53 ± 2.25 <sup>◇□</sup>

▲ $P < 0.01$ , △ $P < 0.05$  vs control; □ $P < 0.01$  vs TNP-470; ■ $P < 0.05$  vs 5-FU; ◇ $P < 0.01$  vs control; □ $P < 0.05$  vs 5-FU; □ $P < 0.01$  vs 5-FU

### 3 讨论

结肠癌是消化道常见肿瘤,恶性程度较高。半个世纪以来,虽然麻醉学和外科手术学有了很大进步,但结肠癌的生存率仍未有明显提高,Dukes A、B1 期 5 年生存率为 85% ~ 90%,Dukes B2 期为 75% ~ 80%,Dukes C 期为 25% ~ 30%。约有 33% 的患者出现复发,50% 的患者死于肿瘤转移<sup>[3]</sup>。大约有 20% ~ 40% 患者临床确诊为结肠癌时已有肝转移,结肠癌根治术后肝转移的发生率仍可达 40% ~ 50%,因结肠癌转移而死亡的患者 50% 以上存在肝转移<sup>[4]</sup>。可见,结肠癌患者的预后主要与有无转移尤其是肝转移密切相关,抑制肝转移将显著提高结肠癌的治疗效果,提高患者

的生存率和生存质量。

肿瘤生长经历两个阶段,无血管期和有血管期,当肿瘤生长至一定体积(1 ~ 2 mm<sup>3</sup> 以上)时便要求有新生血管生成为其继续生长提供营养,同时,肿瘤细胞开始通过血管和淋巴管向周围组织浸润和远处转移,中间经历一系列步骤后,在继发部位形成转移灶,而转移灶的继续生长的和再转移仍然需要新生血管。由于腹腔脏器血液绝大部分回流到肝脏以及肝脏本身的解剖特点,血供丰富的肝脏成为肿瘤细胞着床和再生长的理想场所,因此消化道肿瘤肝转移率极高。从肿瘤转移的各步骤来看,血管抑制剂在肿瘤发生转移的初始和最后阶段均可有效发挥抗癌作用。

TNP-470 是一种烟曲霉素的半合成物,能够特异性地与内皮细胞增殖的活性因子 - 甲硫氨酸-氨基肽酶-2( MetAP-2 )共价结合,封闭其中的活性位点,抑制内皮细胞增殖,从而抑制新生血管形成<sup>[5]</sup>。但也有研究显示,TNP-470 对某些肿瘤细胞的生长也有抑制作用,能够使肿瘤细胞阻滞于 G<sub>1</sub>/S 期,并能诱导肿瘤细胞凋亡和减少分泌 VEGF 等促血管生长因子<sup>[6-8]</sup>。

TNP-470 能使原发肿瘤处于“休眠”或“静止”状态,但对于有恶性转移倾向的实体瘤,TNP-470 对远处转移灶的抑制优于原发灶<sup>[9-10]</sup>。Konno 等<sup>[11]</sup>分别用丝裂霉素和 TNP-470 治疗荷结肠癌裸鼠,丝裂霉素组有 8/10 肝转移,而 TNP-470 组只有 2/8 有肝转移,而且 TNP-470 治疗组肝中转移灶数目较丝裂霉素组明显减少,但丝裂霉素对原发瘤的治疗优于 TNP-470。这说明在抑制肿瘤的转移方面,血管抑制剂作用优于化疗药,但对于原发肿瘤的生长抑制作用不如化疗药。

5-FU 为一种周期性抗代谢药物,是目前较为有效的化疗药,多用于消化道肿瘤的治疗。5-FU 在体内代谢为 5-氟脱氧尿嘧啶核苷酸( 5F-dUMP ),后者抑制脱氧胸苷酸合成酶,阻止脱氧尿苷酸甲基化为脱氧胸苷酸( dTMP ),影响 DNA 的生物合成。另外 5-FU 在体内

转化为5-氟尿密啶核苷酸(5-FUR)后,也能渗入RNA,干扰蛋白质的合成<sup>[12]</sup>。5F-dUMP与5-FU的另两种代谢产物还原型四氢叶酸(5,10CH<sub>2</sub>F<sub>4</sub>)及胸腺嘧啶脱氧核苷(TS)结合成复合物,也阻碍了DNA的合成<sup>[13]</sup>。

TNP-470通过抗肿瘤血管形成而抑制肿瘤生长,而5-FU为一种针对性抑制肿瘤细胞DNA合成的化疗药,本身即可杀死肿瘤细胞或诱导肿瘤细胞凋亡,因此,联合应用应是理想的肿瘤治疗方案。已有研究表明TNP-470联合其它化疗药有增效作用<sup>[14-15]</sup>。TNP-470主要作用靶点为正常的血管内皮细胞,避免了临床大剂量化疗药引起骨髓抑制和长期化疗导致的化疗药耐药问题,这正是TNP-470和其它抗血管形成药的优点所在。

我们实验结果表明,经TNP-470治疗后,不仅裸鼠肝转移发生率下降、肝转移瘤的数量减少,而且转移瘤组织中MVD也显著减少,说明TNP-470主要通过抑制肿瘤新生血管的形成发挥抗肿瘤作用。5-FU通过杀伤肿瘤细胞,减少VEGF的分泌,也能够抑制新生血管形成,减少肿瘤的肝转移。联合治疗组与单独TNP-470或5-FU治疗组相比,裸鼠肝转移率显著下降,转移瘤组织中VEGF表达和MVD计数也明显减少,说明TNP-470与5-FU联合应用具有协同作用。实验同时发现,在抑制结肠癌肝转移作用方面,TNP-470效果要优于5-FU。我们研究结果提示,在结肠癌的综合治疗方案中,血管抑制剂联合化疗药是一种很有应用前景的联合治疗方案,值得临床工作者优先考虑。

致谢:日本大阪Takeda化学公司及Hiroshi Fukui博士提供TNP-470。

#### [参考文献]

- [1] 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(III)[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(1): 89-91.
- [2] Weidner N. Tumor angiogenesis: Review of current application in tumor prognosis[J]. Semin Diagn Pathol, 1993, 10(4): 302-313.
- [3] Zaniboni A. Adjuvant chemotherapy in colorectal cancer with high-dose leucovorin and fluorouracil: Impact on disease-free survival

- and over-survival[J]. J Clin Oncol, 1997, 15(6): 2432-2441.
- [4] Cady B, Stone MD. The role of surgical resection of liver metastasis in colorectal cancer[J]. Semin Oncol, 1991, 18(4): 399-406.
- [5] Sin N, Meng L, Wang MQ, et al. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 4(12): 6099-6103.
- [6] Yoshizawa J, Mizuno R, Yoshida T, et al. Inhibitory effect of TNP-470 on hepatic metastasis of mouse neuroblastoma[J]. J Surg Res. 2000, 93(1): 82-87.
- [7] Yamamoto D, Kiyozuka Y, Adachi Y, et al. Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP-470 on human breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 55(2): 149-160.
- [8] Emoto M, Ishiguro M, Iwasaki H, et al. TNP-470 inhibits growth and the production of vascular endothelial growth factor of uterine carcinosarcoma cells *in vitro*[J]. Anticancer Res, 2000, 20(1c): 601-604.
- [9] Kanai T, Konno H, Tanaka T, et al. Effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on the progression of human gastric cancer xenotransplanted into nude mice[J]. Int J Cancer, 1997, 71(5): 838-841.
- [10] Tanaka T, Konno H, Matsuda I, et al. Prevention of metastasis of human colon cancer by angiogenesis inhibitor TNP-470[J]. Cancer Res, 1995, 55(4): 836-839.
- [11] Konno H, Tanaka T, Matsuda I, et al. Comparison of the inhibitory effect of the angiogenesis inhibitor, TNP-470, and Mitomycin C on the growth and liver metastasis of human colon cancer[J]. Int J Cancer, 1995, 61(2): 268-271.
- [12] Konishi T, Teruya M, Kawahara M, et al. Chemotherapy of gastric cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 1998, 25(4): 504-515.
- [13] Peters GJ, van TB, Backus HH, et al. Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(7): 916-992.
- [14] Ogawa H, Sato Y, Kondo M, et al. Combined treatment with TNP-470 and 5-fluorouracil effectively inhibits growth of murine colon cancer cells *in vitro* and liver metastasis *in vivo*[J]. Oncol Rep, 2000, 7(3): 467-472.
- [15] Qian CN, Min HQ, Lin HL, et al. Combination of angiogenesis inhibitor TNP-470 with cytotoxic drugs in experimental therapy of nasopharyngeal cancer[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2000, 109(7): 641-645.

[收稿日期] 2001-12-10

[修回日期] 2002-02-25

## 欢迎订阅中国肿瘤临床年鉴 2002 年版(2001 年卷)

《中国肿瘤临床年鉴》由中国癌症研究基金会主办,东南大学承办协办,由吴孟超教授等国内肿瘤界著名人士组成编委会。每年一册,2002年版中国肿瘤临床年鉴将于今年9月出版,本年鉴内设专家论坛、评述、一流原著、标准与规范、大事记、医学新闻、新书出版、专题报道、论文摘登、其他(如图片报道……)等栏目,为一本全面反映我国2001年中肿瘤学的成就的具有信息检索功能参考书,预计字数为1百万字,由中国铁道出版社出版。每册(精装本)65元(含邮资)。

订购地址:南京市丁家桥87号东南大学内中国肿瘤临床年鉴编辑出版部。丁茂平收。

由编:210009,电话:(025)3272459