

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0067-02

## 5-Fu 和 $\alpha$ 干扰素抗肿瘤血管形成协同效应的实验研究

耿怀成, 陈龙邦, 尹 鸣, 王靖华, 褚晓源, 张 群 (南京军区南京总医院肿瘤科, 南京 210002)

肿瘤化疗常用的细胞毒药物对肿瘤细胞选择性较差,对正常组织造成一定损伤,有时损伤严重而不得不停止化疗。近年来研究表明,一些化疗药物,如环磷酰胺、长春碱类等具有抑制肿瘤血管作用,为改变化疗药物的临床使用方法、降低毒副反应提供了理论依据。5-Fu 是常用的化疗药,可长期口服给药,其是否有抗血管形成作用目前国内外尚未见报道; $\alpha$  干扰素的抗肿瘤效应及抗血管形成作用已为人们公认。本实验研究这两种药物是否具有抗肿瘤血管形成的协同效应,以期为两者联合应用提供依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

5-Fu、IFN- $\alpha$ -2a、细胞培养基、胎牛血清等试剂。CO<sub>2</sub>培养箱、超净工作台,离心机等设备。

#### 1.2 方 法

##### 1.2.1 胶原基质(matrigel)制备

Matrigel 的制备参考文献[1]完成。

##### 1.2.2 HUVEC、人肺癌细胞 SPC-A-1 的共同培养及血管样结构的形成

HUVEC 的原代培养采用文献[2]所述方法进行;HUVEC、人肺癌细胞 SPC-A-1 的共同培养及血管样结构的观察记录采用文献[3]中所述方法进行并略加改动:①六孔培养板底部覆盖 1% 的琼脂糖溶液,固化 30 min,超净工作台内紫外线照射 30 min 备用。②将培养瓶内的第二代内皮细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化,接种到备好的 6 孔培养板内用含 10% 胎牛血清的 M199 孵育 24 h,显微镜下见细胞呈团块状生长。③继续孵育,待细胞团长到适当密度时吸取加入无菌离心管,500 r/min 5 min。将 matrigel、M199、NaOH 溶液和 HEPES(N-2-羟乙基哌嗪 N'-2-乙磺酸,起稳定溶液的 pH 值作用)按比例 8:1:0.5:0.5 加入上述离心管内,用吸管吹打使各成分混匀、细胞团块均匀分布于 matrigel 中。④24 孔培养板每孔加入混有细胞团的 matrigel 0.5 ml(每组设 5 孔,共 8 组),37℃ 孵育 30 min。⑤将培养待用的人肺癌细胞 SPC-A-1 消化接种到混有内皮细胞团的 matrigel 表面(使每孔细胞数  $5 \times 10^6$ ),分别加入含不同浓度 5-Fu(2.5  $\mu$ g/ml、0.25  $\mu$ g/ml 和 0.025

$\mu$ g/ml)或 IFN- $\alpha$ -2a(10 U/ml、100 U/ml)的 M199(含 10% 胎牛血清)继续孵育(使每孔培养液达 1 ml),空白对照组不接种瘤细胞也不加上述药物;⑥孵育 96 h 观察记录内皮细胞团上小管数。每孔记录 5 个细胞团上的小管总数,用方差分析比较各组之间小管数量有无显著性差异。

### 2 结 果

各组内皮细胞团小管数如表 1 所示。管状结构形成的状态如图 1 所示。

表 1 各组孵育 96 h 内皮细胞团小管数

CM	The number of tubes					
	1	2	3	4	5	$\bar{x} \pm s$
F1	77	74	72	79	75	75.4 $\pm$ 2.7*
F2	40	34	42	38	45	39.8 $\pm$ 4.1*
F3	20	16	17	12	19	16.8 $\pm$ 3.1*
$\alpha$ 1	87	79	83	80	81	82.0 $\pm$ 3.2*
$\alpha$ 2	66	60	65	68	67	65.2 $\pm$ 3.1*
F and $\alpha$	50	48	52	53	55	51.6 $\pm$ 2.7 $\Delta$
无药物组	99	93	87	85	91	91.0 $\pm$ 5.5 $\Delta$
无瘤细胞组	13	11	10	11	91	0.8 $\pm$ 1.5 $\blacktriangle$
对照	17	16	17	12	13	15.0 $\pm$ 3.1

F1,2,3: 培养液含有 5-Fu(0.025  $\mu$ g/ml,0.25  $\mu$ g/ml,2.5  $\mu$ g/ml); $\alpha$ 1、2: 培养液含有 IFN- $\alpha$ -2a(10 U/ml,100 U/ml); F and  $\alpha$ : 培养液含有 5-Fu 0.025  $\mu$ g/ml 和 IFN- $\alpha$ -2a 10 U/ml;无药物组:接种瘤细胞而培养液不加药物;无瘤细胞组:不接种瘤细胞而培养液加入两种药物(5-Fu 0.025  $\mu$ g/ml 和 IFN- $\alpha$ -2a 10 U/ml);对照:不接种瘤细胞,不加药物; $\Delta P < 0.01$  vs 无药物组;  $\blacktriangle P < 0.01$  vs F1 or  $\alpha$ 1;  $\blacktriangle P < 0.01$  vs 对照

### 3 讨 论

恶性肿瘤的血管形成实体肿瘤生长和转移的基

础,其过程非常复杂,受众多正负因子的调控。已经发现干扰素、血管抑素、内皮抑素、TNP-470、苏拉明、内皮细胞生长因子单克隆抗体等具有抗肿瘤血管形成。近

年来有学者发现一些化疗使用的细胞毒药物如长春碱、环磷酰胺、6-甲基硫嘌呤核苷、紫杉醇等有抗血管形成作用。

图1 来自内皮细胞团的微血管样结构(×100)

A: 内皮细胞团初始状态; B: 内皮细胞团块上较密集的微血管状结构; C: 微血管状结构较少

Folkman 认为,化疗药物的抗血管形成作用具有以下特点:化疗药物杀伤内皮细胞的毒性剂量应低于对肿瘤细胞的毒性剂量;化疗药物能干扰内皮细胞功能;化疗药物能阻滞血管形成的某个关键步骤从而阻止新血管的形成<sup>[4]</sup>。本实验结果表明 IFN- $\alpha$  和 5-Fu 在较低浓度时即能显著抑制肿瘤细胞对内皮细胞增殖、迁移的促进作用,在一定浓度范围抑制作用随浓度增高而增强。5-Fu 对内皮细胞有直接作用。IFN- $\alpha$  和 5-Fu 同时使用时具有协同效应。

5-Fu 的抗血管形成机制有待进一步探讨。这种作用可能通过干扰内皮细胞的增殖、迁移实现,其对肿瘤细胞血管形成因子的表达、内皮细胞血管形成因子受体的表达有无抑制作用,需进一步阐明。两种药物的不同作用机制也许是发生协同效应的基础。

本实验结果仅提示两种药物在体外具有抗血管形成协同效应。在动物体内、人体内是否有同样作用有待于进一步研究。

[关键词] 5-Fu;  $\alpha$  干扰素; 肿瘤血管形成

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

#### [参考文献]

- [1] 耿怀成, 陈龙邦, 褚晓源, 等. 人参皂苷 Rg3 抗血管形成作用的实验研究[J]. 医学研究生学报, 2001, 14(4): 323-325.
- [2] 孙卫民. 细胞因子研究方法[M]. 第1版, 上海第二军医大学出版社, 1999年, 550.
- [3] Folkman J. Angiogenesis *in vitro*. [J] Nature, 1978, 288: 551-556.
- [4] Timothy Bowder, Catherine E. Butterfield: Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60: 1878-1888.

[收稿日期] 2004-03-24

[修回日期] 2004-09-10

[本文编辑] 王莹, 韩丹

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》创刊于1994年,经国家科委和国家新闻出版署正式批准,由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家正式医学期刊(刊号为CN31-1725/R)。本刊旨在交流学术、促进科研、面向应用,主要刊登与肿瘤生物治疗有关的基础理论与临床的研究论文、新实验技术及其研究成果等。《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价:8.00元,全年定价:32.00元,邮发代号:4-576,请通过邮局订阅。也可从本刊编辑部订阅,请将40.00元(含邮资)寄本刊编辑部并注明详细通讯地址及邮政编码,本刊编辑部将负责如期寄至您的手中。

联系地址:上海市翔殷路800号第二军医大学免疫楼

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联系人:王莹

邮政编码:200433

联系电话:021-55620605×22; 021-25070316×22