

吡柔比星在体外胃癌组织温热化疗中作用的研究

王晓光¹, 傅军¹, 郑航¹, 李国新², 罗荣城¹(南方医科大学南方医院¹肿瘤中心,²普外科,广东广州510515)

摘要:目的 比较吡柔比星和其他化疗药物的对胃癌组织温热协同作用,探讨化疗药物与温热化疗的协同作用机制。方法 利用36个病例的手术切除胃癌组织,建立人胃癌组织体外立体培养作用模型,MTS-PMS比色法检测组织培养物活性以了解化疗药物以及温热化疗的抑瘤效果。HE染色研究评价药物对胃癌组织在组织形态学上的改变。结果 顺铂、丝裂霉素和吡柔比星对胃癌组织的杀伤均具有较强的温热协同关系($P=0.000$),吡柔比星单独处理和温热协同处理均具有较强的抑制作用,和其他3种药物抑制率比较具有显著性差异($P<0.05$)。吡柔比星和温热协同处理效果与胃癌病例的临床分期和组织学分级有关($P=0.000$),而与年龄、性别、肿瘤大小及术前CEA水平无关($P>0.05$)。HE染色表明,吡柔比星和温热处理后,胃癌组织大部崩解,细胞变性坏死,细胞核固缩,胞浆散失。结论 THP对胃癌组织具有良好的温热协同效应和肿瘤杀伤效果,具有进一步临床研究价值。

关键词:吡柔比星;温热效应;胃癌

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)10-1487-04

Effects of pirarubicin chemotherapy combined with hyperthermia on gastric cancer *in vitro*

WANG Xiao-guang¹, FU Jun¹, ZHENG Hang¹, LI Guo-xin², LUO Rong-cheng¹

¹Department of Oncology, ²Department of General Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of pirarubicin (THP) in combination with hyperthermia on gastric cancer tissues *in vitro* and explore the underlying mechanisms. **Methods** *In vitro* three-dimensional culture models were established with tissue biopsies from 36 patients with pathologically confirmed gastric cancer. The tumor cell viability was measured by MTS-PMS assay, and HE staining was used to study the histomorphological changes of the tissues following chemotherapy and hyperthermia. **Results** Synergistic tumor cell-killing effects of cisplatin, THP, and mitomycin with hyperthermia was observed in the tumor tissues ($P=0.000$), and THP exhibited stronger cytotoxic effects than the other drugs. Histomorphological study suggested strong killing effects of THP on the tumor tissues, which displayed disrupted tissue structure, cellular degradation and necrosis, karyopyknosis and karyolysis, with cytoplasm loss. The anti-tumor effects of THP were associated with clinical staging and pathological grading of the tumors ($P=0.000$), but not with the patients' gender, age, tumor size and preoperative CEA levels ($P>0.05$). **Conclusion** Pirarubicin shows good synergistic effects with hyperthermia, and the cytotoxicity of pirarubicin against gastric cancer tissue is enhanced considerably by mild hyperthermia. THP can be a potential therapeutic drug for intraperitoneal chemohyperthermia.

Key words: pirarubicin; hyperthermia; gastric cancer

消化道恶性肿瘤是临床最常见的恶性肿瘤,目前手术切除仍是治疗消化道肿瘤的首选方法,但对进展期胃肠道恶性肿瘤,根治手术后仍有较高的复发率。术中腹腔内温热灌注化疗(HIPEC)直接作用于上述复发和转移部位,对预防胃肠道恶性肿瘤根治术后复发有一定作用,且副作用小,是近年来国内外研究的热点之一^[1,2]。然而,对于浸润腹膜下较深的肿瘤,HIPEC化疗后仍有腹膜复发^[3,4]。因此,研究和应用穿透性好的药物,提高药物穿透能力,增强热的渗透效应将是今后的研究方向。吡柔比星(THP)是新一代蒽环类抗肿瘤药物,国外报道表明,肿瘤细胞对THP的摄入非

常迅速,排出较慢,细胞内能保留高浓度^[5]。本研究拟建立胃癌组织小块三维培养技术,研究THP对胃癌组织的温热协同效应和作用机制。

1 材料和方法

1.1 胃癌标本

2004-2005年本院行根治性胃大部切除或胃全切的胃癌手术标本36例,均经病理学明确诊断。其中,男22例,女14例,年龄33-85岁,平均60.7岁。患者临床分期、病理组织学分类、术前CEA水平和肿瘤直径资料见表1。

1.2 化疗药物

顺铂购自齐鲁制药厂,THP由深圳万乐医药有限公司提供,丝裂霉素为日本协和发酵产品,氟尿嘧啶注射液(5-Fu)为浙江海普制药公司产品。药物储存液根据说明书进行配制,储存于-20℃冰箱。

收稿日期:2006-01-07

作者简介:王晓光(1968-),男,博士,主治医师,电话:020-62787735,13825131097,E-mail:wxc@nfhoc.com

通讯作者:罗荣城(1958-),男,教授,博士生导师,电话020-61641651,E-mail:lrc@nfhoc.com

表 1 药物对胃癌组织的温热协同效应

Tab.1 Synergistic effects between the drugs and hyperthermia against gastric cancer tissues

Drug	Drug+37 °C(Mean±SD)%	Drug+43 °C(Mean±SD)%	t	P
5-Fu	12.6±8.4	14.2±10.3	0.880	0.385
Mitronrycin C	42.4±10.2	54.1±6.8	8.675	0.000
Cisplatin	46.5±11.3	58.6±9.3	8.099	0.000
THP	62.4±9.6	76.3±10.8	8.553	0.000

1.3 试剂和耗材

无酚红 RPMI 1640 和胎牛血清为 Hyclone 公司产品;MTS 购自 Promega 公司; 硫酸酚嗪甲酯 (phenazine methosulfate, PMS)、DMSO、新霉素和两性霉素 B 均为 Sigma 公司产品; 胶原蛋白海绵为北京益而康生物技术有限公司产品, 规格为 10 cm×1.5 cm×0.1 cm, 海绵使用前剪成 0.5 cm 大小;24 孔培养板为 Costar 产品。

1.4 温热效应研究

根据 Hoffman 等方法^[6],剥离手术标本表面的脂肪和纤维组织,用 PBS 清洗其表面的血污和脏物,然后将标本置于含有抗生素的浸泡液 (新霉素 50 μg/ml, 两性霉素 5 μg/ml) 中浸泡 15 min。再加入 1640 培养液进行洗涤,用手术刀将标本尽量切割成 1 mm 大小的小块,3 块组织块加入胶原海绵上, 然后转移至已预加培养基 0.6 ml 的 24 孔板孔中,培养箱 37 °C 培养过夜。第 2 天每孔沿孔壁缓慢加入含有药物的培养基 0.4 ml,每个药物浓度 3 个平行孔,于 42 °C 作用 1 h,然后吸出药物,培养基洗 2 次,加入新鲜培养液 1 ml 继续培养 3 d。目前 THP 在温热化疗方面的应用报道甚少,本研究参考其静脉用药剂量(40 mg/m²),浓度设定为 32 μg/ml。其它药物浓度参考文献^[1],其中顺铂处理浓度为 50 μg/ml,丝裂霉素浓度为 15 μg/ml,5-Fu 为 350 μg/ml。

1.5 MTS-PMS 比色法

MTS 的配制:以 DPBS 配制成为 2 mg/ml,0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装。PMS 的配制:以 PBS 配制成为 100 mmol/L 的贮存液,0.22 μm 滤膜过滤除菌,4 °C 避光保存。MTS-PMS 使用液:在新配制的 MTS(2 mg/ml) 中以 20:1 体积比加入 PMS 混和即用。MTS-PMS 测定方法:24 孔培养板每孔加入 100 μl 的 MTS-PMS 使用液,继续培养 4 h 后,振荡 10 min,每孔取 100 μl,以 490 nm 的波长测定吸光度值 (OD₄₉₀),取 3 个平行孔均值。

抑制率(%)=(对照孔 OD- 加药孔 OD)/(对照孔 OD- 空白孔 OD)×100%。

1.6 HE 染色

MTS-PMS 测定完成以后,吸去培养液,加入

PBS,于板式振荡器上洗涤 3 次,直至蓝色消失,然后将组织小块置于 10%中性甲醛中 4 °C 固定 48 h,经系列乙醇脱水,石蜡包埋后切片。切片经苏木素和伊红染色,显微镜下观察温热化疗前后肿瘤组织形态学变化。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计分析软件。化疗药物温热协同作用与单独化疗药物两组比较采用配对 t 检验; THP 和临床因素的关系采用线性回归分析。

2 结果

2.1 温热化疗对胃癌组织的作用

4 种药物对胃癌组织均具有一定的杀伤作用(表 1)。其中,顺铂、丝裂霉素和 THP 三种药物具有温热协同效应,温热处理的抑制作用均较单独处理有所增强 (t 分别为 8.099,8.675,8.553;P 均为 0.000);5-Fu 未见明显温热协同效应(t=0.880,P=0.385)。THP 单独处理和温热协同处理均具有较强的抑制作用,和其他 3 种药物抑制率比较具有显著性差异(P<0.05)。

2.2 THP 对胃癌组织作用和临床因素的关系

THP 对胃癌组织的抑制作用和一些临床因素的相关性研究表明(表 2),THP 对肿瘤的抑制效应和年龄、性别、术前 CEA 水平和肿瘤大小无关(P>0.05),而与肿瘤的病理学分级和临床分期有关(P<0.05)。研究表明,肿瘤分化程度越低,THP 的作用亦减少(P=0.000);随着临床分期增加,THP 作用呈现下降趋势(P=0.020)。

表 2 胃癌病例背景资料和 THP 温热协同效应

Tab.2 Clinical data of the gastric cancer patients and synergistic effects between pirarubicin and hyperthermia

Variable	n	THP inhibition ratio (Mean±SD)%
Gender		
Male	22	78.1±11.6
Female	14	73.5±9.2
Age(year)		
>50	26	75.6±8.9
<50	10	76.6±11.6
Pathologic histology		
Well differentiated adenocarcinoma	4	90.6±5.5
Moderately differentiated adenocarcinoma	10	84.8±4.7
Poorly differentiated adenocarcinoma	20	69.9±8.4
Signet-ring cell carcinoma	2	69.0±3.3
Tumor diamter(cm)		
>2	28	75.1±11.3
≤2	8	80.5±7.8
Preoperative CEA(ng/ml)		
>5	12	76.5±10.7
<5	24	76.0±11.4
Clinical stage(TNM)		
I	5	85.5±5.6
II	15	75.2±9.5
III	13	77.4±11.0
IV	3	62.1±9.4

2.3 组织形态学研究

HE 染色结果表明(图 1),药物和温热协同对肿瘤组织作用均可造成肿瘤细胞变性,坏死,细胞核固

缩,并有大量核碎片化现象。THP 和温热协同对胃癌组织的作用最强,视野下肿瘤组织形态几乎崩解,细胞严重坏死,细胞核大部分固缩,胞浆散失。

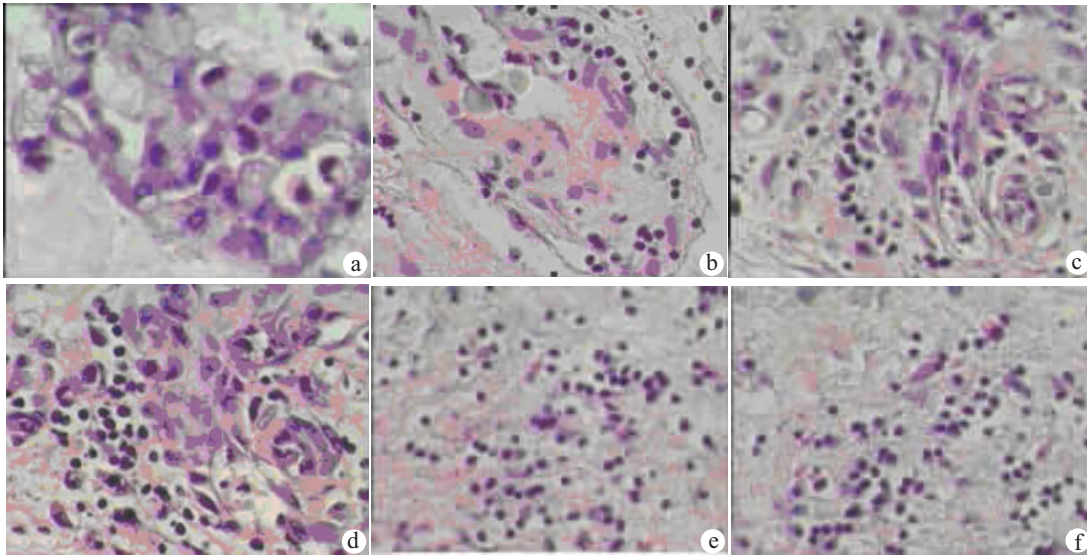


图 1 药物和温热协同对胃癌组织的作用

Fig.1 Synergistic effects of the drugs with hyperthermia against gastric cancer tissues

(a: Control; b: 42°C+DDP; c: 42°C+MMC; d: 42°C+5-Fu; e: 37°C+THP; f: 42°C+THP)

3 讨论

胃癌占消化道肿瘤死亡人数的一半和各种恶性肿瘤死亡总数的 1/5,居恶性肿瘤死亡的前列。近些年来,随着外科手术的进展,采用了广泛淋巴结清除的根治术,术后淋巴结复发已明显减少,取而代之的是腹腔转移和复发。如何预防术后腹腔复发是胃肠道肿瘤急待解决的问题。

目前,术中腹腔内温热灌注化疗已逐渐成为大多数学者公认的目前治疗进展期胃肠道肿瘤的有效方法,腹腔化疗具有药代动力学优势,腹腔给药的药物效能显著大于静脉给药,达数十倍至数百倍。术中腹腔内温热灌注化疗使胃肠道肿瘤术后腹腔转移和复发取得明显疗效,并能显著提高生存率,但其中还有许多细节问题值得探讨,如化疗药物的选择,具体方法的选择,药液容量的确定,剂量的确定等,都是亟待于解决的问题。国外研究表明,对于浸润腹膜下较深的肿瘤,HIPEC 化疗后仍有腹膜复发。因此,研究和应用穿透性好的药物,提高药物穿透能力,增强热的渗透效应将是今后的研究方向。

THP 是 1979 年日本学者梅泽滨夫等半合成的新一代蒽环类抗肿瘤抗生素,由于其化学结构中有一四氢吡喃基团,因此能够部分绕过 gp170 糖蛋白所介导的对阿霉素的耐药性^[7]。研究表明,白血病细胞 HL-60 对 THP 的摄入非常迅速,在 1 μg/ml 的浓度下

30 s 内 THP 的累积摄入量为 0.262 μg,主要吸收进入细胞核;而阿霉素仅为 0.0015 μg,大部分处于胞浆,同时,THP 的排出较慢,细胞内能保留高浓度^[8]。Sugano 等在膀胱癌腔内灌注动物模型中的研究表明,THP 对癌肿有较强的穿透性,能够在 60 min 内穿透 2-3 mm 组织,而阿霉素仅能穿透 1 mm^[9]。因此,THP 在温热灌注化疗中具有较好的临床应用前景。

目前,国际上有关 THP 在温热灌注化疗中的基础研究和临床应用的报道甚少。本研究结果显示 THP 和温热协同具有良好的协同效应,其 42 °C 协同对胃癌组织的杀伤效应高于目前的常用药如顺铂、丝裂霉素和 5-Fu。本研究前期工作表明,人胃癌 MGC-803 细胞经 THP 和温热协同处理后,处于 S 期的细胞增多,G₂/M 期细胞减少,并出现大量的坏死和凋亡细胞。尤其是 43 °C 处理后,基本上由凋亡和坏死细胞组成,仅有少量 G₀/G₁ 期细胞^[11]。有报道表明,THP 对处于 G₂/M 期细胞的杀伤作用最强,而对 G₀/G₁ 期细胞的杀伤作用较弱。Takahashi 等研究还证实,温热协同不能增加细胞对 THP 的摄取^[10]。因此,通过温热处理阻滞细胞周期于 G₂/M 期,是增加细胞对 THP 的敏感性的重要机制。组织形态学研究证实,THP 和温热协同处理后,肿瘤组织形态几乎崩解,细胞严重坏死,细胞核大部分固缩、溶解,胞浆散失,表明 THP 合并温热处理具有良好的协同杀伤作用。

另外,临床因素相关性分析表明,THP 合并温热处理的杀伤作用和患者年龄、性别,肿瘤大小和术前 CEA 水平没有明显关系,而与胃癌的组织病理学分级和临床分期有关,其杀伤作用随肿瘤分化程度降低和临床分期升高而呈现下降的趋势。国外临床试验研究表明,术中温热灌注化疗的临床疗效和临床分期有关,对于胃癌 II、III 期患者,HIPEC 能够显著延迟复发,延长患者生存时间,而对于 III 期以上患者,HIPEC 并无显著性生存优势^[3]。考虑到 HIPEC 的术中副作用和相关并发症,选择合适的临床分期和组织学分级病例进行 HIPEC 治疗不失为有效的胃癌围手术期治疗手段。

综上所述,THP 对胃癌组织具有良好的温热协同效应和肿瘤杀伤效果,具有腹腔内温热灌注化疗的研究应用价值。

参考文献:

- [1] Witkamp AJ, de Bree E, van Goethem R, et al. Rationale and techniques of intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2001, 27(6): 365-74.
- [2] Glehen O, Mohamed F, Gilly FN. Peritoneal carcinomatosis from digestive tract cancer: new management by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemohyperthermia [J]. *Lancet Oncol*, 2004, 5(4): 219-28.
- [3] Fujimoto S, Takahashi M, Kokayashi K, et al. Relation between clinical and histologic outcome of intraperitoneal hyperthermic perfusion for patients with gastric cancer and peritoneal metastasis [J]. *Oncology*, 1993, 50(5): 338.
- [4] Fujimura T, Yonemura Y, Muraoka K, et al. Continuous hyperthermic peritoneal perfusion for the prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer: randomized controlled study [J]. *World J Surg*, 1994, 18(1): 150.
- [5] Sugiyama T, Sadzuka Y, Nagasawa K, et al. Membrane transport and antitumor activity of pirarubicin, and comparison with those of doxorubicin [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1999, 90(7): 775-80.
- [6] Furukawa T, Kubota T, Hoffman RM. Clinical applications of the histoculture drug response assay [J]. *Clin Cancer Res*, 1995, 1(3): 305-11.
- [7] Furukawa T, Kubota T, Murata H, et al. Antitumor spectra of anthracyclines against gastric cancer tissues obtained from surgical specimens with reference to P-glycoprotein expression [J]. *J Surg Oncol*, 1998, 69(3): 173-7.
- [8] Kubota T, Furukawa T, Tanino H, et al. Pirarubicin might partly circumvent the P-glycoprotein-mediated drug resistance of human breast cancer tissues [J]. *Anticancer Res*, 1998, 18(2A): 967-72.
- [9] Sugano O, Shoji N, Hatakeyama T, et al. Investigation of retention time of intravesical instillation therapy with pirarubicin (THP) [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1996, 23(9): 1169-74.
- [10] Moriyama-Gonda N, Igawa M, Shiina H, et al. Heat-induced membrane damage combined with adriamycin on prostate carcinoma PC-3 cells: correlation of cytotoxicity, permeability and P-glycoprotein or metallothionein expression [J]. *Br J Urol*, 1998, 82(4): 552-9.
- [11] 孙跃民, 傅军, 袁兴华, 等. 吡柔比星在体外胃癌细胞温热化疗中协同作用的探讨. *中国肿瘤临床*, 2005, 32(18): 1045-8
- [12] Furusawa S, Nakano S, Wu J, et al. Potentiation of pirarubicin activity in multidrug resistant cells by rifampicin [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(12): 1303-6.
- [13] Takahashi T, Mitsuhashi N, Sakurai H, et al. Thermal enhancement of pirarubicin (THP-adriamycin) by mild hyperthermia *in vitro* [J]. *Int J Hyperthermia*, 1997, 13(3): 317-24.