

5-氟尿嘧啶在小鼠结肠癌模型中的 药效与毒性评价研究

唐雪莲¹, 付京花¹, 박 현², 杨新颖³

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 韩国圆光大学 医学院, 全罗北道 益山 570749, 韩国;
3 中国科学院 上海药物研究所, 上海 201203)

摘 要:为探讨 5-氟尿嘧啶的药效、毒性与给药剂量之间的关系,采用 BALB/c 小鼠来源的 CT26 结肠癌细胞株构建小鼠结肠癌模型,分别给予 10、20、30 和 50 mg/kg 剂量的 5-氟尿嘧啶,分析其抗肿瘤效果、对小鼠体质量的影响和死亡率等指标.结果表明,5-氟尿嘧啶的体内抑瘤效果及毒性与剂量密切相关.综合分析评价各指标,认为 20~30 mg/kg 剂量的 5-氟尿嘧啶较适合于小鼠结肠癌模型中的药效评价.

关键词:5-氟尿嘧啶; 药效; 毒性; 结肠癌
中图分类号: R73-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2012)04-0535-04

Efficacy and Toxicity of 5-Fluorouracil in Colon Cancer Treatment of a Mouse Syngeneic Model

TANG Xue-lian¹, FU Jing-hua¹, PARK Hyun², YANG Xin-ying³

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 School of Medicine, Wonkwang University, Cholla-bukdo, Iksan 570749, South Korea;
3 Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: To investigate the relationship of anticancer effects, toxicity and dose, tumor syngeneic models were made from murine colorectal adenocarcinoma cell line CT26 derived from BALB/c mice. Mice were treated with various doses (10, 20, 30 and 50 mg/kg) of 5-fluorouracil (5-FU), and the indexes were analyzed, including the anti-tumorigenic effects, body mass and mortality of mice. The results showed that the efficacy and toxicity of 5-FU was closely related to the doses, and the proposal dose was 20–30 mg/kg which may be the optimal dose for drug research in tumor syngeneic model of mice.

Key words: 5-fluorouracil; efficacy; toxicity; colon cancer

结肠癌是世界上致死率较高的疾病之一.在美国,结肠癌在癌症病人的死亡率中位居第二位^[1-2]. 尽管 5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、依立替康等有一定的毒性,但它们仍然是临床常用的几种抗结肠癌药物^[3-5]. 在抗肿瘤新药研究中,体内试验是必要的. 5-氟尿嘧啶常被用作阳性药来间接评价新药的药效,但不同研究者采用 5-氟尿嘧啶作为阳性药时使用的药物剂量不一^[6-8]. 剂量不同,5-氟尿嘧啶

的药效与毒性差异很大,若试验中选用的剂量不合适,可能会因药效不好或毒性过大引起动物死亡率过高进而发挥不了阳性药的对照效果. 本文对 5-氟尿嘧啶在小鼠结肠癌模型中的药效与毒性进行研究,评价 5-氟尿嘧啶的药效和毒性与给药剂量之间的关系,得到适合的剂量,以期对 5-氟尿嘧啶在体内结肠癌模型研究中作为阳性药时的剂量选择提供参考.

收稿日期:2012-04-01
作者简介:唐雪莲(1976—),女,讲师,博士;通信作者:杨新颖(1973—),女,讲师,博士,E-mail: xinyingyang@yahoo.com.cn
基金项目: The Public Welfare & Safety Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2011-0020967); 国家自然科学基金(31001117)

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

细胞培养试剂为 Invitrogen 公司(美国)产品,5-氟尿嘧啶(Sigma 公司,美国)用无菌生理盐水配制,其他常规化学试剂均为 Sigma 公司(美国)产品。

1.2 细胞培养

BALB/c 小鼠来源的 CT26 细胞株购自韩国细胞库(the Korean Cell Line Bank, 韩国,首尔)。采用含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液于 37℃ 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱培养,培养液中含青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μg/mL)。

1.3 动物及分组

动物试验在韩国圆光大学医学院实验动物中心进行。5 周龄雌性 BALB/c 小鼠 50 只(SPF 级,购自 Orient Bio. 公司,韩国,首尔)。按后续试验操作,随机分为 5 组。

1.4 小鼠体内结肠癌模型的制备及药物效果观察

小鼠皮下结肠癌模型参考文献[9]方法制备。取培养的 CT26 细胞用无血清 RPMI1640 调整为 $2 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ 注射于小鼠右前腋下的皮下部位,观察肿瘤的生长情况,待 1 周后各组肿瘤直径为 4~5 mm 时,将荷瘤小鼠随机分为 5 组;1 组为空白对照组,腹腔注射生理盐水,每日 1 次,连续 5 d;另外 4 组按体质量分别腹腔注射 10、20、30、50 mg/kg 的 5-氟尿嘧啶,每日 1 次,连续 5 d。定期称小鼠体质量,给药前一天记为第 0 天,第 0 天的荷瘤小鼠的体质量为初始体质量,不同天数的体质量变化率根据公式[(测定体质量/初始体质量)×100%]计算。每隔 3 d 用游标卡尺测量肿瘤的直径,按照公式(长×宽²)/2 计算肿瘤体积,待对照组肿瘤直径为 15 mm 时^[10],将所有小鼠用乙醚麻醉后,分离肿瘤,摘取肺、脾、胸腺、肝称质量,用体积分数为 10% 的甲醛固定后,石蜡包埋,切片,HE 染色,显微镜下观察肿瘤及各组织的形态学变化。

1.5 数据处理与统计学分析

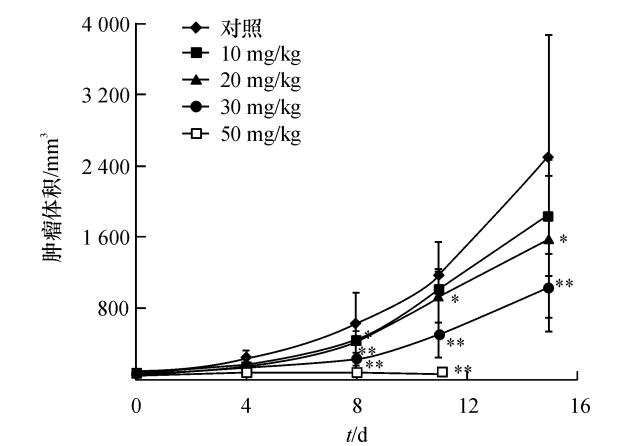
所有数据采用“平均值±标准误”表示。统计学检

验采用 SPSS 12.0 软件包单因素方差分析处理。

2 结果

2.1 5-氟尿嘧啶抗肿瘤效果

在小鼠体内结肠癌模型中,5-氟尿嘧啶表现出剂量依赖性抗肿瘤效果(图 1),10 mg/kg 剂量组有一定的抑制趋势,但效果不显著;20 和 30 mg/kg 剂量组与对照组相比差异显著,尤其是 30 mg/kg 组,在第 15 天时,抑瘤率达 56%。50 mg/kg 组的肿瘤体积与给药前相比几乎没有变化,其抑制效果最显著。从肿瘤切片的结果也可观察到相似的结果,10 mg/kg 组与空白组相似,20 mg/kg 组肿瘤细胞主要聚集于肿瘤块周围,中央的细胞大部分坏死,30 和 50 mg/kg 组坏死面积更大(图 2)。



同一时间与对照组比较,*示 0.05 水平差异显著,**示 0.01 水平差异显著,t 检验。

图 1 5-氟尿嘧啶抗肿瘤效果
Fig. 1 Anti-tumor effects of 5-fluorouracil in mice

2.2 5-氟尿嘧啶对小鼠体质量和存活率的影响

从表 1 中可以看出,空白组体质量在试验期间比较接近初始体质量,而 10 和 20 mg/kg 组体质量有所增加;30 mg/kg 组先减少,后恢复到接近初始体质量;50 mg/kg 组小鼠从第 8 天开始出现死亡,至第 10 天仅有 2 只小鼠存活,但状态特别差,体质量大幅下降,此时处死取样,用作切片分析。

表 1 小鼠体质量变化率及死亡率¹⁾
Tab. 1 Changes in body mass and mortality of mice

处理	体质量变化率/%							死亡率 /%
	第 0 天	第 3 天	第 5 天	第 8 天	第 10 天	第 12 天	第 15 天	
对照组	100.00 ± 5.97	100.31 ± 5.00	101.77 ± 4.15	101.81 ± 4.71	102.87 ± 3.98	102.30 ± 6.18	101.86 ± 6.95	0
10 mg/kg 组	100.00 ± 2.71	101.01 ± 2.98	101.06 ± 2.86	103.18 ± 3.97	105.03 ± 4.23	107.06 ± 4.84	106.32 ± 6.42	0
20 mg/kg 组	100.00 ± 2.68	101.39 ± 3.25	100.93 ± 2.98	102.28 ± 3.81	105.72 ± 3.34	108.00 ± 3.98	109.94 ± 6.28	0
30 mg/kg 组	100.00 ± 2.93	99.21 ± 2.52	97.04 ± 2.78	84.68 ± 3.67	88.80 ± 6.60	97.08 ± 7.31	102.18 ± 5.82	0
50 mg/kg 组	100.00 ± 2.74	100.04 ± 2.82	92.35 ± 2.16	74.23 ± 3.16	68.90 ± 1.05			100

1) n=10,给药前一天为第 0 天,第 0 天的荷瘤小鼠的体质量为初始体质量,不同天数的体质量变化率根据公式(测量体质量/初始体质量×100%)进行计算。

2.3 5 - 氟尿嘧啶对小鼠各组织的毒性

肺、脾、胸腺、肝等各组织的质量指数见表 2. 除 50 mg/kg 组外,肺和肝的质量变化不大,但脾和胸腺指数却有明显改变. 组织切片染色结果发现,除 50 mg/kg 组有轻度的炎症损伤外,各组的肺的病理变化很小

(图 2). 脾和胸腺在 10 和 20 mg/kg 组没有变化,但在 30 和 50 mg/kg 组有明显的淋巴坏死及淋巴数目减少的变化(图 2). 肝脏的病理变化最明显,即使在 10 mg/kg 组也有局部的炎性渗透,其他组更加明显,50 mg/kg 组炎性渗透范围更大甚至出现坏死(图 2).

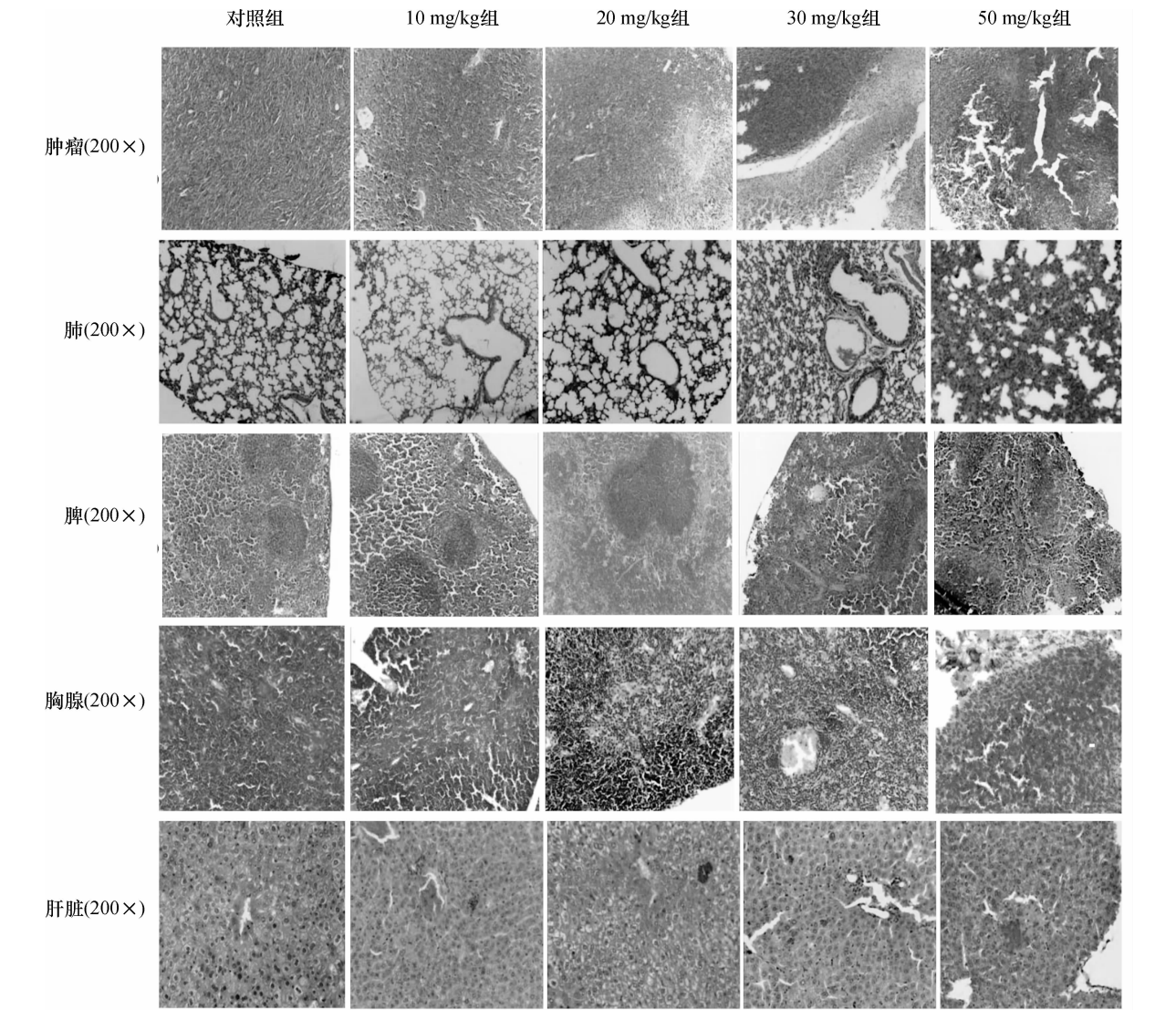


图 2 小鼠肿瘤及不同组织 HE 染色结果

Fig. 2 Representative images following hematoxylin and eosin (HE) staining of tumor and the tissues in mice

表 2 小鼠各脏器质量变化¹⁾

Tab. 2 Mass changes of the tissues of mice

组别	$m_{肺}/g$	脾指数	胸腺指数	$m_{肝}/g$
对照组	0.18 ± 0.01	1.18 ± 0.29	0.21 ± 0.03	1.26 ± 0.14
10 mg/kg 组	0.19 ± 0.02	1.24 ± 0.19	0.19 ± 0.05	1.24 ± 0.10
20 mg/kg 组	0.18 ± 0.02	1.32 ± 0.22	0.18 ± 0.05	1.29 ± 0.16
30 mg/kg 组	0.19 ± 0.04	$2.03 \pm 0.47^{**}$	$0.11 \pm 0.03^{**}$	1.31 ± 0.10
50 mg/kg 组	$0.14 \pm 0.02^{**}$	$4.30 \pm 0.38^{**}$	$0.05 \pm 0.01^{**}$	$1.01 \pm 0.18^{*}$

1) 除 50 mg/kg 组 $n=2$ 外,其余各组 $n=10$; 脾(胸腺)指数 = [脾(胸腺)质量 $\times 1\ 000$] / [体质量 $\times 10$]; * 示与对照组比较 0.05 水平差异显著, ** 示与对照组比较 0.01 水平差异极显著, t 检验.

3 讨论

体内试验在抗肿瘤新药研究中非常必要,癌症的临床治疗,5 - 氟尿嘧啶常被用作阳性药来间接评价新药的药效. 剂量不同,5 - 氟尿嘧啶的药效与毒性差异很大,若试验中选用的剂量不合适,可能会因药效不好或毒性过大引起动物死亡率过高进而发挥不了阳性药的对照效果.

本研究结果发现 5 - 氟尿嘧啶的体内抑瘤效果与剂量密切相关,毒性也是如此. 10 mg/kg 剂量的抑瘤效果较差. 50 mg/kg 剂量抑瘤效果最好,但毒性特

别大,动物的死亡率高,不适合使用.从抑瘤效果看30 mg/kg 剂量比20 mg/kg 剂量好,但从体质量变化方面比较,20 mg/kg 剂量体质量呈增长趋势,30 mg/kg剂量先下降后增长,且30 mg/kg 剂量对脾、胸腺及肝脏等组织有影响,说明30 mg/kg 剂量的毒性仍然较大.20 mg/kg 剂量抑瘤率虽然较差,但体质量及组织变化很小,尤其是对免疫系统几乎没影响,因此有利于动物利用自身的免疫系统抵抗肿瘤.以上结果表明20~30 mg/kg 剂量的5-氟尿嘧啶较适合于小鼠结肠癌模型中的药效评价.关于5-氟尿嘧啶在其他小鼠抗癌模型中剂量的应用也有不同报道.Cusack 等^[11]在人结肠癌细胞株 LoVo 裸鼠结肠癌模型中采用5-氟尿嘧啶作为阳性药,其剂量为33 mg/kg,腹腔注射,每周2次,整个试验周期为32 d. Stankova 等^[12]在人结肠癌细胞株 SW-620 的裸鼠模型中同样采用了5-氟尿嘧啶作为阳性药,其剂量为20 mg/kg,分别在试验的第4、8、12、16天腹腔注射,每天1次. Houghton 等^[13]对包括5-氟尿嘧啶在内的几种抗肿瘤药物在小鼠抗癌模型中的效果及毒性进行了评价,结果发现5-氟尿嘧啶的最大耐受量是50 mg/kg. Ciomei 等^[14]在人结肠癌细胞株 HCT-116 裸鼠肿瘤模型研究中也采用了50 mg/kg 的剂量. Harris 等^[15]在人结肠癌细胞株 HT29 裸鼠肿瘤模型研究中采用了65 mg/kg 的剂量.这些文献报道的剂量与本文有差异主要是因为所采用的动物模型、5-氟尿嘧啶来源以及使用方法不同等因素造成.总之,在试验时,应该根据具体情况合理选择药物的剂量,才能很好地起到阳性药的作用.

参考文献

- [1] GENNARELLI M, JANDORF L, CROMWELL C, et al. Barriers to colorectal cancer screening: Inadequate knowledge by physicians[J]. Mt Sinai Med, 2005, 72(1): 36-44.
- [2] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [3] WOLPIN B M, MAYER R J. Systemic treatment of colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2008, 134(5): 1296-1310.
- [4] OHTSU A. Chemotherapy for metastatic gastric cancer: past, present, and future[J]. J Gastroenterol, 2008, 43(4): 256-264.
- [5] WILLIAM-FALTAOS S, ROUILLARD D, LECHAT P, et

- al. Cell cycle arrest by oxaliplatin on cancer cells[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2007, 21(2): 165-172.
- [6] JUNG G R, KIM K J, CHOI C H, et al. Effect of betulinic acid on anticancer drug-resistant colon cancer cells[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2007, 101(4): 277-285.
- [7] ALEXANDRE J, NICCO C, CHÉREAU C, et al. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir[J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(4): 236-244.
- [8] CUSACK J J, LIU R, XIA L, et al. Neuteboom ST and palladino Ma. NPI-0052 enhances tumoricidal response to conventional cancer therapy in a colon cancer model[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(22): 6758-6764.
- [9] LUO Xiao-ling, YU Yi-zhi, LIANG An-min, et al. Intratumoral expression of MIP-1 beta induces antitumor responses in a pre-established tumor model through chemoattracting T cells and NK cells[J]. Cell Mol Immunol, 2004, 1(3): 199-204.
- [10] CHIKKANNA-GOWDA C P, MCNALLY S, SHEAHAN B J, et al. Inhibition of murine K-BALB and CT26 tumour growth using a Semliki Forest virus vector with enhanced expression of IL-18[J]. Oncol Rep, 2006, 16(4): 713-719.
- [11] CUSACK J C Jr, LIU Rong, XIA Li-jun, et al. NPI-0052 enhances tumoricidal response to conventional cancer therapy in a colon cancer model[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(22): 6758-6764.
- [12] STANKOVA J, SHANG Ji-jun, ROZEN R. Antisense inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase reduces cancer cell survival *in vitro* and tumor growth *in vivo*[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5): 2047-2052.
- [13] HOUGHTON J A, CHESHIRE P J. HALLMAN J D, et al. Evaluation of irinotecan in combination with 5-fluorouracil or etoposide in xenograft models of colon adenocarcinoma and rhabdomyosarcoma[J]. Clin Cancer Res, 1996, 2(1): 107-118.
- [14] CIOMEI M, CROCI V, CIAVOLELLA A, et al. Antitumor efficacy of edotecarin as a single agent and in combination with chemotherapy agents in a xenograft model[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(9): 2856-2861.
- [15] HARRIS S M, MISTRY P, FREATHY C, et al. Antitumour activity of XR5944 *in vitro* and *in vivo* in combination with 5-fluorouracil and irinotecan in colon cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 2005, 92(4): 722-728.

【责任编辑 柴 焰】