

生长因子刺激新生血管生成的作用全部或部分通过诱导 VEGF 表达而实现<sup>[2,3]</sup>; (4) 已有人研究用 VEGF 的单克隆或多克隆抗体有效抑制新生血管生成和肿瘤生长,并有应用反义 VEGF cDNA 质粒转染肿瘤细胞、抑制胶质瘤血管生成和肿瘤生长的实验研究<sup>[4-6]</sup>。

胶质瘤抗血管生成能抑制肿瘤生长,机制可能是诱导内皮细胞凋亡,另外还有缺乏 VEGF 的持续作用致使肿瘤血管稀疏和管径缩小,使血流在整个血管网内灌流减少甚至停滞。这表明 VEGF 不仅是对新生血管生成,而且对已经形成的血管的塑形、血管网络的建立和维持均是一个决定性因素<sup>[5,6]</sup>。针对 VEGF 的抗血管生成治疗能抑制肿瘤细胞的生长以及在血管中的运动,从而也达到抑制肿瘤浸润的治疗目的<sup>[6,7]</sup>。

本实验使用 VEGF 反义寡核苷酸后,实验 I 组大鼠的肿瘤生长呈不规则的萎缩状态,没有明显的增强效应;实验 I 组大鼠没有观察到明显的肿瘤影像;而对照组大鼠的肿瘤呈膨胀性生长,有坏死和明显的水肿,有明显的增强效应,间接地说明了 VEGF 反义寡核苷酸的抗血管生成的效果。实验组与对照组的抑瘤率有非常显著的差异 ( $P < 0.01$ ),提示 VEGF 反义寡核苷酸原位治疗颅内荷瘤大鼠可以较好抑制肿瘤生长,而且当浓度较大时(如实验 I 组)能使肿瘤停止发展,呈镜下的瘤巢组织,表明针对 VEGF 的抗血管生成治疗并不能完全杀灭肿瘤。因没有作较长时间的观察,实验 II 组的治疗效果能维持多长时间、应该实施什么样的治疗方案和药物浓

度、注射次数和间隔时间以及毒副作用等方面尚需继续探讨和研究。

### [参考文献]

- [1] Morreale VM, Herman BH, Der-Minassian V, et al. A brain-tumor model utilizing stereotactic implantation of a permanent cannula[J]. *J Neurosurg*, 1993, 78(6): 959-965.
- [2] Nguyen M. Angiogenic factors as tumor markers[J]. *Invest New Drugs*, 1997, 15(1): 29-37.
- [3] Teai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF[J]. *J Neurosurg*, 1995, 82(5): 864-873.
- [4] Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(23): 5421-5425.
- [5] Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(16): 8761-8766.
- [6] Yuan F, Chen Y, Delhan M, et al. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(25): 14765-14770.
- [7] Kim KI, Lu B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 841-844.

[收稿日期] 2001-06-10

[修回日期] 2001-09-20

[本文编辑] 谢冰

### • 经验交流 •

## 两性霉素 B 和两性霉素 B 脂质体体外抗真菌的实验研究

徐红, 廖万清, 温海, 赵瑾, 仇芸 (第二军医大学长征医院皮肤科真菌室, 上海 200003)

[关键词] 两性霉素 B; 脂质体; MIC

[中图分类号] R 978.5

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2002)01-0031-02

本实验室于 1999 年 1 月至 3 月用美国国家临床试验标准化委员会(NCCLS)方案对上海 4 家医院提供的 91 株致病真菌进行了两性霉素 B(cAmB)和两性霉素 B 脂质体(AmBosome)的体外药敏试验,现将结果报告如下。

### 1 材料和方法

1.1 实验菌株 长海医院提供:新生隐球菌 3 株;长征医院提供:新生隐球菌 15 株,白念珠菌 19 株,黄曲霉 2 株,烟曲霉 2 株,青霉菌 2 株,总状毛霉 1 株;瑞金医院提供:新生隐

球菌 4 株,白念珠菌 17 株,热带念珠菌 8 株,类星型念珠菌 2 株,黑曲霉 1 株,克柔念珠菌 2 株,链互隔菌 2 株,总状毛霉 1 株,土生念珠菌 1 株;华山医院提供:新生隐球菌 9 株。

1.2 NCCLS 方案的最小抑菌浓度(MIC)值测定

1.2.1 培养基 (1)RPM1 1610 液;将 RPM1 1640 粉末(10.4 g)和 NaHCO<sub>3</sub>粉末(2.0 g)溶于 900 ml 蒸馏水中,加 3-

(下转第 37 页)

[作者简介] 徐红(1966-),女(汉族),主管技师。

- 190-195.
- [2] Que TG, Phau VA, Phau VH, *et al.* Cholangiocarcinomas express Fas ligand and activate the Fas receptor[J]. *Hepatology*, 1999, 30(6): 1398-1404.
- [3] Tepper CG, Seldin M. Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma[J]. *Blood*, 1999, 194(5): 1727-1737.
- [4] Zhang XD, Franco A, Myers K, *et al.* Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(11): 2747-2753.
- [5] 魏金尾, 武玉东, 刘会凡, 等. Fas 配体基因在肾细胞癌中的表达及意义[J]. *中化实验外科杂志*, 2001, 17(3): 215-216.
- [6] Kataoka T, Schroter M, Hahne M, *et al.* FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin, granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation[J]. *J Immunol*, 1998, 161(5): 3936-3942.

[收稿日期] 2001-08-06

[修回日期] 2001-10-30

[本文编辑] 邓晓群

(上接第31页)

吗啡丙烷磺胺(MOPS)至终浓度为 0.165 mol/L, 振荡直至其溶解, 同时用 1 mol/L NaOH 调整其 pH 值至 7.0(25℃), 然后定容至 1 L, 滤过消毒, 4℃ 备用。(2)沙氏液: 按常规方法配制, 且将其 pH 值调至 7.0。

1.2.2 抗真菌药物 cAmB(批号为 1003022)和 AmBisome(批号为 9AMP01), 二种药物均由上海先锋药业提供, 实验时, 首先制成浓度为 80 μg/ml 的贮存液, -20℃ 备用。

1.2.3 分组 每一受试菌株准备 11 支无菌试管, 0~10 依次编号, 其中 0 号管为对照管(只加培养液和菌液), cAmB 和 AmBisome 母液用 RPMI 1640 液倍比稀释至下列浓度: 40~0.078 μg/ml, 每一相应试管加 0.1 ml。

1.2.4 菌悬液的制备 受试菌株应经两次沙氏葡萄糖琼脂培养液(SDA)液活化, 以保证菌落的纯化和活力(培养温度为 35℃), 将活化菌株划线接种平皿, 24 h 后取 2 个直径为 1 mm 的菌落划线接种于 2 ml 生理盐水中振荡 15 min, 用血细胞计数板将浓度调至 (1~5) × 10<sup>6</sup> cfu/ml 之间。丝状真菌菌悬液的制备: 新鲜移种真菌培养 10 d 后在培养管中加入 2 ml 无菌生理盐水, 轻微振荡, 用无菌玻璃棒轻轻摩擦菌落, 使孢子从菌丝上脱落, 再用多层无菌纱布过滤, 获得孢子悬液, 其余同上。

1.2.5 接种 将上述菌悬液用 RPMI 1640 液首先稀释 100 倍充分混匀后, 再稀释 20 倍, 将 0.9 ml 菌和培养基混合液加至上述 11 支试管中, 此时接种菌的终浓度为 (0.5~2.5) × 10<sup>3</sup> cfu/ml 之间, 而 AmBisome 与 cAmB 终浓度依次为 8~0.015 μg/ml, 将接种好的试管充分摇匀, 置 35℃ 培养 46~50 h(酵母菌)或 27℃ 培养 8 d(丝状真菌)后观察结果。

1.2.6 结果判定 NCCLS 方案建议将完全不生长的前一管判定为终点, 有拖尾现象时采用 80% 抑制判定法, 即将生长对照管内的培养物用 RPMI 1640 液进行 1:4 稀释后, 将其浓度最近似的培养管判定为终点。

## 2 结果

本研究采用 NCCLS 推荐的 M27-P 方案, 酵母菌经 46~50 h, 丝状真菌经 8 d 得观察结果, 可知 AmBisome 组的 MIC 范围为 0.125~8 μg/ml, MIC<sub>50</sub> 平均为 0.500 0 μg/ml, MIC<sub>90</sub> 范围为 0.25~1 μg/ml, 平均为 0.796 7 μg/ml, cAmB 组的

MIC 范围为 0.125~8 μg/ml, MIC<sub>50</sub> 范围为 0.25~0.5 μg/ml, 平均为 0.396 7 μg/ml, MIC<sub>90</sub> 范围为 0.25~1 μg/ml, 平均为 0.946 7 μg/ml。

## 3 讨论

我们选用 NCCLS 推荐的微量肉汤稀释法<sup>[1]</sup>对 91 株致病真菌进行了 MIC 测定, 同传统的液基稀释法、琼脂稀释法、琼脂扩散法比较, 最明显的优点是可重复性较强, 结果更可靠, 而且药敏试验的时间缩短, 缺点是操作复杂, 本次试验的结果表明 AmBisome 的抗真菌效价稍高于 cAmB, 同国内外类似报道相一致<sup>[2]</sup>。

众所周知, 体外 MIC 测定只是间接反映抗真菌药物在体内的抗菌活性, 二者相关, 但非完全平行, 这次试验中就有 1 例隐球菌性脑膜炎患者, 体外药敏试验非常敏感, cAmB 与 AmBisome 的 MIC 都是 0.25 μg/ml, 浓度比较低, 但临床用药效果却不明显, 隐球菌菌体始终杀不死, 每次实验室检查均可查到隐球菌。通过这例患者的诊治体验, 我们考虑实验因素可能对结果将有一定的影响, 比如不同的 pH 值、培养温度、接种密度等, 在以后的实验中还有待进一步的摸索, 希望能找到一个更接近于体内实验的实际情况, 但实验条件至少大体上既不影响实验药物的抗真菌活性, 也不抑制致病真菌的生长繁殖。

前面提到 NCCLS 操作步骤复杂, Wanger<sup>[1]</sup>首先对 NCCLS 方案的 6 株标准参照株进行了 Etest 法检测, 其结果与 NCCLS 方案相一致。另外, 他们对 91 株分离自临床患者的白念珠菌进行了检测, 其结果与 NCCLS 方案的一致性高达 95%~97%, 因此, 两种方法的一致性令人满意的, Etest 方法克服了 NCCLS 的操作复杂性, 将可能很快被推广。

## [参考文献]

- [1] NCCLS. National committee for clinical laboratory standards reference method broth dilution antifungal susceptibility testing for yeast[P]. Document M-27-p. Villanova, 1992, 2: 1-22.
- [2] 吴绍恩, 郭宁如, 廖万清. 现代真菌病诊断治疗学[M]. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1997. 274-275.

[收稿日期] 2001-06-28

[修回日期] 2001-08-30

[本文编辑] 邓晓群