

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780005059.8

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101384255A

[22] 申请日 2007.2.9

[21] 申请号 200780005059.8

[30] 优先权

[32] 2006.2.9 [33] US [31] 60/771,678

[86] 国际申请 PCT/US2007/061951 2007.2.9

[87] 国际公布 WO2007/092964 英 2007.8.16

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.11

[71] 申请人 癌症治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 路吉·莱纳兹 古鲁·雷迪

道尔拉·米勒约夫斯基

[74] 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有
限责任公司

代理人 肖善强 南 霆

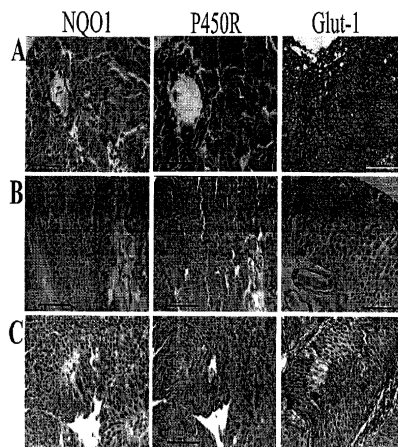
权利要求书2页 说明书23页 附图6页

[54] 发明名称

使用 E09 和丙二醇治疗膀胱癌

[57] 摘要

本发明公开了各种膀胱癌的治疗及其方法。本发明公开的内容利用丙二醇浓缩液和/或 NAD(P)H: 醌氧化还原酶-1(NQO1)、细胞色素 P450 氧化还原酶(P450R)和葡萄糖载体 1(Glut-1)在人体膀胱移行细胞癌中的蛋白质表达,从而提供以个体为靶向的膀胱癌治疗。



1. 一种在溶液中含有 EO9 的药学制剂，所述溶液的丙二醇（PG）浓度选自约 30% vol/vol PG，约 20% vol/vol PG 和约 10% vol/vol PG。
2. 如权利要求 1 所述的药学制剂，其中所述制剂包括 EO9 浓度为约 300 μM 至约 400 μM 的溶液。
3. 如权利要求 1 所述的药学制剂，其中，所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM 的溶液。
4. 如权利要求 1 所述的药学制剂，其中，所述制剂进一步包括 NaHCO_3 、EDTA、甘露醇和水。
5. 如权利要求 4 所述的药学制剂，其中，所述制剂包括约 10 mg/mL 至约 120 mg/mL 的 NaHCO_3 。
6. 如权利要求 5 所述的药学制剂，其中，所述制剂包括约 100 mg/mL 的 NaHCO_3 。
7. 如权利要求 5 所述的药学制剂，其中，所述制剂包括约 50 mg/mL 的 NaHCO_3 。
8. 如权利要求 4 所述的药学制剂，其中，所述制剂包括约 0.5 mg/mL 至约 3.0 mg/mL 的甘露醇。
9. 如权利要求 8 所述的药学制剂，其中，所述制剂包括约 0.625 mg/mL 的甘露醇。
10. 如权利要求 8 所述的药学制剂，其中，所述制剂包括约 1.25 mg/mL 的甘露醇。
11. 如权利要求 1 所述的药学制剂，其中，所述制剂包括在含有 EDTA、丙二醇和水的溶液里约 100 mg/mL 的 NaHCO_3 、约 0.625 mg/mL 的甘露醇和约 0.1 mg/mL 的 EO9。
12. 一种在含有丙二醇、EDTA 和水的溶液中含有 EO9、 NaHCO_3 和甘露醇的药学制剂，其中，存在于所述溶液中的所述丙二醇在选自如下的百分率范围：约 6%至约 14% vol/vol，约 16%至约 24% vol/vol，约 26%至约 34% vol/vol。

13. 如权利要求 12 所述的药制剂, 其中, 存在于所述溶液中的所述丙二醇具有选自如下的百分率: 约 10% vol/vol, 约 20% vol/vol 和约 30% vol/vol。

14. 如权利要求 12 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM , 且丙二醇浓度为约 10% vol/vol 的溶液。

15. 如权利要求 12 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM , 且丙二醇浓度为约 20% vol/vol 的溶液。

16. 如权利要求 12 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM , 且丙二醇浓度为约 30% vol/vol 的溶液。

17. 如权利要求 12 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括约 10 mg/mL 至约 120 mg/mL 的 NaHCO_3 。

18. 如权利要求 17 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括约 100 mg/mL 的 NaHCO_3 。

19. 如权利要求 17 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括约 50 mg/mL 的 NaHCO_3 。

20. 如权利要求 12 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括约 0.5 mg/mL 至约 3.0 mg/mL 的甘露醇。

21. 如权利要求 20 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括约 0.625 mg/mL 的甘露醇。

22. 如权利要求 20 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括约 1.25 mg/mL 的甘露醇。

23. 如权利要求 12 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM , 丙二醇浓度为约 10% vol/vol, NaHCO_3 为约 100.25 mg/mL 并且甘露醇为约 0.625 mg/mL 的溶液。

24. 如权利要求 12 所述的药制剂, 其中, 所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM , 丙二醇浓度为约 30% vol/vol, NaHCO_3 为约 100.25 mg/mL 并且甘露醇为约 0.625 mg/mL 的溶液。

使用 EO9 和丙二醇治疗膀胱癌

相关申请的交叉引用

本申请要求于 2006 年 2 月 9 日递交的美国临时专利申请 60/771,678 的优先权。

技术领域

本发明涉及采用 EO9 配制品治疗膀胱癌及其方法。本发明利用丙二醇浓缩液和/或 NAD(P)H:醌氧化还原酶-1 (NQO1)、细胞色素 P450 氧化还原酶 (P450R) 和葡萄糖运载体 1 (Glut-1) 在人体膀胱移行细胞癌中的蛋白表达, 从而提供以个体为靶向的膀胱癌治疗。

背景技术

膀胱癌是全世界第七大癌症。2000 年, 膀胱癌是当年英国男性中被诊断的 9,000 个新癌症病例中的第四大癌症[1]。估计 2002 年欧洲有 280,000 例膀胱癌, 2004 年美国有 60,000 多的新病例。

膀胱癌的最常见类型 (约 90%) 是移行细胞癌 (TCC), 其由膀胱上皮衍生, 所述膀胱上皮为尿道系统 (输尿管、膀胱和尿道) 的细胞衬里。移行细胞癌 (TCC) 可被分类为浅表性 (pTa 和 PT1) 或肌层浸润性 (\geq pT2)。目前浅表性 TCC 的治疗是经尿道切除术 (TURBT; 即手术切除所有可见病灶), 接着佐以化学疗法或免疫疗法。这种治疗方法的有效性通过如下证明: 与单独的 TURBT 相比, 观察到佐以化学疗法后浅表性肿瘤的复发显著降低了[2]。尽管常规使用诸如丝裂霉素 C (MMC)、表阿霉素和 ECG 的试剂, 但是人们广泛认识到需要开发一种更有效和/或毒性更低的抗 TCC 试剂, 或者对可能受益的个体 (或病理子群) 进行靶向治疗来说, 能更好地使用当前疗法。

丝裂霉素 C (MMC) 是一种天然存在的醌基抗肿瘤试剂, 其属于一类

被称为生物还原药物的化合物[3]。一般而言，生物还原药物是前药（pro-drug），其需要代谢活化作用从而产生细胞毒素代谢物，并且原则上都被设计成根除存在于固体肿瘤的不利灌注区中的缺氧细胞。然而，这些药物也可以以肿瘤中的有氧部分为目标。

测定醌基生物还原药物的细胞毒素选择性（即，缺氧肿瘤细胞与有氧肿瘤细胞之间）的关键参数是：还原前药所需特定还原酶的存在和分子氧反转活化过程的能力[4,5]（尽管在测定细胞杀伤中还原酶和氧压的相对作用依赖于所讨论的化合物而发生变化[4,6]）。在 TCC 治疗中常规使用 MMC 的事实暗示了，这种疾病不仅具有生物还原活化作用所需的适当生物化学机能，而且这类化合物中的其它化合物也可用于治疗这种疾病。同样可用的其它化合物的两个实例包括吡啶醌衍生物 EO9 和氮杂环丙烷基苯醌 RH1[7,8]。

正如所记载的，醌基生物还原药物根除有氧细胞或缺氧细胞的能力主要取决于，肿瘤酶学（包括存在的还原酶）和缺氧之间的复杂关系。已暗示了在生物还原药活化过程中的数种还原酶[4,6]，但是注意力主要集中到了细胞色素 P450 氧化还原酶（P450R）和 NAD(P)H:醌氧化还原酶-1（NQO1）。关于缺氧的测量，已表明诸如葡萄糖运载体 1（Glut-1）或碳酸酐酶 IX（CAIX）之类的内生标记物与诸如哌莫硝唑（pimonidazole）之类的外生缺氧标记物相关 [9,10]。因此，在浅表性和浸润性膀胱移行细胞癌（TCC）中肿瘤缺氧和上述两种重要还原酶的表达之间的关系非常重要。而且，以浅表性肿瘤或肌层浸润性肿瘤为目标，需要使用具有不同渗透谱（penetration profile）的膀胱癌治疗药制剂。本发明涉及膀胱癌治疗的上述方面。

发明内容

发现在浅表性肿瘤和肌层浸润性肿瘤之间 NQO1 表达上具有显著差异，观察到浸润性肿瘤中表达水平较低。与此相反，P450R 和 Glut-1 在 TCC 的所有阶段和等级中表达，但是表达随着肿瘤阶段而增强（特别在 Glut-1 的情况下）。另外，Glut-1 表达在 G3 肿瘤中显著增强，但是存在低

水平的 NQO1。这些结果表明，在浅表性和浸润性膀胱 TCC 之间，NQO1 和 Glut-1 的表达存在明显差异。另外，发现了具有不同渗透谱的醌基生物还原药物的药物制剂。

这些结果对醌基生物还原药物的治疗意义在于：对于浅表性疾病，单一试剂疗法是适当的，而对于肌层浸润性疾病，需要使用以缺氧部分为靶向的醌和根除有氧部分的其它治疗方式的组合疗法。而且当治疗浅表性膀胱癌时，可以采用具有较低渗透谱的药学制剂，而当治疗浸润更多肌层的膀胱癌时，可以采用具有较高渗透谱的药学制剂。将本发明的这些方面合起来考虑，通过为个体疾病的特定特征设计癌症疗法，从而为膀胱癌的治疗提供了重要的推动作用。

具体地，本发明的一个实施方式包括治疗膀胱癌的方法，所述方法包括：测定肿瘤中至少一种酶的水平；基于该至少一种酶的水平选择疗法，其中，所述疗法包括：单独施予醌基生物还原药物或与其它疗法组合施予醌基生物还原药物。

在另一实施方式中，所述酶选自 NAD(P)H:醌氧化还原酶-1 (NQO1) 和 NADPH 细胞色素 P450 氧化还原酶 (P450R)。在一具体实施方式中，所述酶是 NQO1，所述疗法包括：单独施予醌基生物还原药物。在另一具体实施方式中，所述酶是 NQO1，所述疗法包括：与其它疗法组合施予醌基生物还原药物。在另一具体实施方式中，所述酶是 P450R，所述疗法包括：单独施予醌基生物还原药物。在另一具体实施方式中，所述酶是 P450R，所述疗法包括：与其它疗法组合施予醌基生物还原药物。在本发明的另一实施方式中，所述酶是 NQO1 和 P450R，所述疗法包括：单独施予醌基生物还原药物。在另一实施方式中，所述酶是 NQO1 和 P450R，所述疗法包括：与其它疗法组合施予醌基生物还原药物。

本发明的一个实施方式还包括，测定肿瘤中缺氧的水平；基于至少一种酶的水平 and 缺氧水平选择疗法。在特定实施方式中，通过测量葡萄糖运载体 1 (Glut-1) 和/或碳酸酐酶 IX (CAIX) 来测定缺氧水平。

本发明的具体实施方式包括一种治疗膀胱癌的方法，所述方法包括：基于如下量度选择疗法，所述量度选自 NAD(P)H:醌氧化还原酶-1

(NQO1)的水平、NADPH 细胞色素 P450 还原酶 (P450R) 的水平和葡萄糖运载体-1 (Glut-1) 的水平, 其中所述疗法包括单独施予醌基生物还原药物或与其它疗法组合施予醌基生物还原药物。在这个具体实施方式的各个方面中, 所述量度可以为 NQO1 或 P450R, 所述疗法包括: 单独施予醌基生物还原药物; 所述量度可以为 NQO1 或 P450R, 所述疗法包括: 与其它疗法组合施予醌基生物还原药物; 所述量度可以为 NQO1 和 P450R, 所述疗法包括: 单独施予醌基生物还原药物; 所述量度可以为 NQO1 和 P450R, 所述疗法包括: 与其它疗法组合施予醌基生物还原药物; 或者所述量度可以为 NQO1、P450R 和 Glut-1, 所述疗法包括: 单独施予醌基生物还原药物或与其它疗法组合施予醌基生物还原药物。

在本发明的一个实施方式中, 本发明包括一种治疗浸润性膀胱癌的方法, 所述方法包括: 测定肿瘤中 NQO1 和 Glut-1 的水平; 选择与其它疗法组合的包括醌基生物还原药物的组合疗法, 因为 NQO1 水平低于、并且所述 Glut-1 水平高于如果所述肿瘤是浅表性的情况下将观测到的。

在本发明的另一实施方式中, 本发明包括一种根据患者膀胱肿瘤中的 NQO1 和 Glut-1 的表达水平将用于适当疗法的患者进行分层管理的方法, 所述方法包括: 确定患者膀胱肿瘤中的 NQO1 和 Glut-1 的表达水平; 如果所述患者患有具有高水平 NQO1 的浅表性膀胱癌, 那么以单一试剂疗法施予生物还原药物, 或者如果所述患者患有具有低 NQO1 和高 Glut-1 水平的浸润性膀胱癌, 那么施予与放射疗法或其它化学疗法组合的组合疗法, 所述组合疗法中, 使用生物还原药物。

在本发明的具体实施方式中, 其它疗法是放射疗法和/或施予至少一种化学疗法试剂。

在各种实施方式中, 具体可用的醌基生物还原药物选自: 丝裂霉素 C、吡啶醌衍生物 EO9、氮杂环丙烷基苯醌 (RH1) 及其组合。

本发明还包括药制剂。具体地, 本发明的一个实施方式包括一种在如下溶液中含有 EO9 的药制剂, 所述溶液中丙二醇 (PG) 的浓度选自约 30% vol/vol PG, 约 20% vol/vol PG 和约 10% vol/vol PG。可以存在的 EO9 的浓度在约 300 μ M 至约 400 μ M 的范围内。在一特定实施方式中, 所

述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM 的溶液。

本发明的药制剂可以进一步包括 NaHCO_3 、EDTA、甘露醇和水。在一个实施方式中，所述制剂包括约 10 mg/mL 至约 120 mg/mL 的 NaHCO_3 。在一特定实施方式中，所述制剂包括约 100 mg/mL 或约 100.25 mg/mL 的 NaHCO_3 。在另一特定实施方式中，所述制剂包括约 50 mg/mL 的 NaHCO_3 或约 50.125 mg/mL 的 NaHCO_3 。在另一实施方式中，所述制剂包括约 0.5 mg/mL 至约 3.0 mg/mL 的甘露醇。在一特定实施方式中，所述制剂包括约 0.625 mg/mL 的甘露醇。在另一特定实施方式中，所述制剂包括 1.25 mg/mL 的甘露醇。在另一特定实施方式中，所述制剂包括约 100 mg/mL 的 NaHCO_3 ，约 0.625 mg/mL 的甘露醇和约 0.1 mg/mL 的 EO9 的溶液，所述溶液包括 EDTA、PG 和水。

本发明的一个实施方式包括一种在含有 PG、EDTA 和水的溶液中包含 EO9、 NaHCO_3 和甘露醇的药制剂，其中，存在于所述溶液中的所述 PG 在选自如下的百分率范围内：约 6%至约 14% vol/vol、约 16%至约 24% vol/vol、约 26%至约 34% vol/vol。在另一实施方式中，存在于所述溶液中的所述 PG 的百分率选自约 10% vol/vol、约 20% vol/vol 和约 30% vol/vol。在另一实施方式中，所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM 并且 PG 浓度为约 10% vol/vol 的溶液。在另一实施方式中，所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM 并且 PG 浓度为约 20% vol/vol 的溶液。在另一实施方式中，所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM 并且 PG 浓度为约 30% vol/vol 的溶液。本发明的这些所述实施方式可以包括约 10 mg/mL 至约 120 mg/mL 的 NaHCO_3 ，在一个具体实施方式中，可以包括约 100、约 100.25 或约 50.125 mg/mL 的 NaHCO_3 。本发明的这些所述实施方式还可以包括约 0.5 mg/mL 至约 3.0 mg/mL 的甘露醇，在一个具体实施方式中，包括约 0.625 或约 1.25 mg/mL 的甘露醇。

本发明的一个实施方式包括一种药制剂，其中，所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM ，PG 浓度为约 10% vol/vol， NaHCO_3 为约 100.25 mg/mL 和甘露醇为约 0.625 mg/mL 的溶液。另一实施方式可以包括一种药制剂，其中，所述制剂包括 EO9 浓度为约 347 μM ，PG 浓度为约 30%

vol/vol, NaHCO_3 为约 100.25 mg/mL 和甘露醇为约 0.625 mg/mL 的溶液。

附图说明

图 1 示出了三名患有膀胱移行细胞癌的患者中的 NQO1、P450R 和 Glut-1 的免疫组织化学分析。

图 2 示出了用于研究药物渗透穿过多细胞层的装置。

图 3 示意性地表示药物溶液制剂。

图 4 示出了掺入 WV14 作为内标的空白样品的色谱图。

图 5 示出了 EO9 标准物在 RPMI1640 培养基中的色谱图。

图 6 示出了 EO9 标准物在 0.1% DMSO 中 (6A)；在 30% 丙二醇中 (PG; 6B)；在 20% PG 中 (6C) 和在 10% PG (6D) 中的色谱图。

图 7 示出了 EO9 在 0.1% DMSO 中和在各种浓度 PG (30%; 20%; 10%) 中的校准曲线。

图 8 示出了在各种浓度 PG 中的 EO9 通过 DLD-1 多细胞层的渗透率。

图 9 示出了经染色 DLD-1 多细胞层的典型横截面。

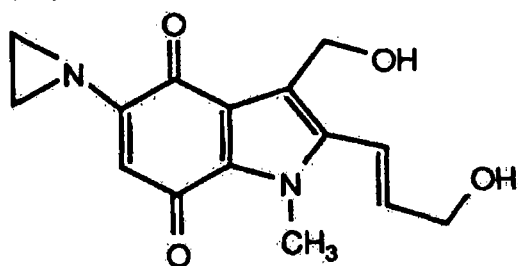
具体实施方式

醌基生物还原药物是前药，其在酶活化后产生细胞毒素物质。酶 NAD(P)H:醌氧化还原酶 (NQO1; 也被称为 DT-心肌黄酶 (DTD)) 是双电子还原酶，其在有氧条件下醌基生物还原药物的活化中起主要作用。醌基生物还原药物在缺氧条件 (包括具有低 NQO1 活性的细胞) 下也具有细胞毒性。单电子还原酶 (诸如细胞色素 P450 还原酶) 在缺氧条件下活化醌基生物还原药物中起更主要的作用。基于前述内容，还原酶的水平 and 缺氧条件可以表明不同癌症疗法适当与否，包括使用不同醌基生物还原药物适当与否。因此，本发明评估在各种等级和阶段的 TCC 中的所述还原酶的水平 and 缺氧条件。

提供含有醌基生物还原药物具有各种渗透谱的药学制剂也可以改善膀胱癌的治疗。例如，当治疗浅表性膀胱癌时，使用具有较低渗透谱的药学制剂是有益的，因为该药物在最需要治疗的膀胱的表面附近残留。与此相

反，当治疗浸润更多肌层的膀胱癌时，具有较高渗透谱的药学制剂是有益的，因为在这些情况下，该药物会渗透到最需要治疗的膀胱的较深层。将本发明的各个方面合起来考虑，通过为个体疾病的特定特征设计癌症疗法，从而为膀胱癌的治疗提供了重要的进步。

Apaziquone (prop. INN, USAN), 也被称为 EO9 或 NSC-382459 (具有如下结构式的 3-羟甲基-5-氮杂环丙烷基-1-甲基-2-(1H-吡啶-4,7-二酮)-丙烯醇) :



该化合物是一种完全合成的生物还原烷基化吡啶酮。人们相信活化 EO9 的基本机理与其它吡啶酮的基本机理类似，所述机理包括：通过转移一个或两个电子的细胞酶进行还原，分别形成半醌和氢醌。在有氧条件下氧化半醌导致氧化还原循环，该循环可以通过形成活性氧物质 (ROS) 导致 DNA 链断裂，从而导致细胞死亡。尤其是在缺氧条件下，半醌/氢醌会烷基化并且交联 DNA 和其它大分子，从而导致细胞死亡。EO9 是适于本发明使用的醌基生物还原药物的非限制性实例。

实施例 1

I. 材料和方法

A. 人体组织

根据医药研究委员会 (Medical Research Council) 的规定，在首先获得当地研究和伦理委员会 (LREC) 的同意后，将福尔马林固定、石蜡包埋的人体膀胱移行性细胞癌的样本 (n=52) 用于此项研究。将所有患者的详细资料匿名从而确保机密性，并且根据 LREC 颁布的规定进行所有实验。此项研究所用肿瘤代表了人体膀胱 TCC 的所有等级 (11 个等级 1; 26 个等级 2; 15 个等级 3)，包括浅表性阶段 (19 个 pTa; 19 个 pT1) 和肌

层-浸润性阶段（14 个 \geq T2）二者。所有肿瘤块用于构成组织微阵列（TMA），并且随后进行免疫组织化学分析。

B. 组织微阵列的构建

组织微阵列结构（TMA）由石蜡包埋块构成，从而表示人体膀胱 TCC 的各个等级（G1-G3）和各个阶段（pTa, pT1, \geq T2）。采用 Bubendorf 等的改进方法[11]利用 Beecher 仪器微阵列仪（Silver Spring, MD, USA）得到组织微阵列结构（TMA），文献[11]通过引用插入本文。简而言之，将每块经石蜡包埋的原料块的切片采用苏木精和曙红（H&E）染色，通过显微镜检查并在石蜡块上标记含有感兴趣组织的区域。在这些代表区域上进行冲击活组织检查（punch-biopsied）得到圆柱形孔（600 μ M），并将其转移到受体块中。组织取样使用来自每个肿瘤块的四个孔，从而为每个母块上提供代表数据。每个 TMA 块包括总共 108 个孔样品（代表 26 名患者），制成两块 TMA 块。从受体 TMA 块上切下切片（厚 5 μ M），并利用传送带系统（Instrumedics, USA）安装在载玻片上。为了验证组织学和样品的完整性，对从每块微阵列块上切下的第一切片和每序列第十切片上进行 H&E 染色。然后，对 TMA 载玻片进行免疫组织化学分析。

C. 抗体

所用抗体包括：针对 NQO1 的小鼠单克隆抗体（由 Drs. Siegel 和 Ross, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, USA 提供）、对 P450R 具有特异性的山羊多克隆抗体（Santa Cruz Biotechnology, USA）、针对 Ki67 的小鼠单克隆抗体（BD Biosciences, UK）和对葡萄糖运载体-1 具有特异性的野兔多克隆抗体（GLUT-1; Dako, UK）。

D. 免疫组织化学

正如先前所述和本领域技术人员所理解的，通过免疫组织化学评估 NQO1、P450R、GLUT-1 和 Ki67 的免疫定位 (Immunolocalisation)。简而言之，在抗原修复并阻塞非特异性免疫球蛋白结合后，采用合适的初级抗体培养 TMA：采用在 TBSTM (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.2% Tween 20, 5% 脱脂干奶粉) 中以 1: 1 稀释的抗-NQO-1 抗体培养约 60 分钟；采用在 PBS 中 1: 100 稀释的 P450R 培养约 90 分钟；采用在 PBS 中以 1: 25 稀释的抗-Glut-1 抗体培养约 90 分钟；或采用在 PBS 中以 1: 100 稀释的抗-Ki67 抗体在 4°C 下培养整夜。使用常规 IgG 替代初级抗体进行对照实验。利用适当的生物素化的次级抗体 (以 1: 200 稀释；Vector Labs., USA) 完成免疫定位，接着采用 Vectastain ABC 试剂盒 (Vector Labs., USA) 进行信号放大，并采用 3,3'-二氨基对二氨基联苯 (DAB) (Vector Labs., USA) 进行可视化。然后，采用 Harris' 苏木精对各切片进行复染色，脱水、清洁并镶嵌在 DPX 包埋剂 (Sigma, UK) 中。

E. 免疫组织化学染色的半定量分析

由三名独立的观测者对阳性免疫染色进行半定量计数。将肿瘤中的 NQO1 和 P450R 二者在细胞质上定位。基于染色的强度和分布，对每个肿瘤核的上皮区进行计数，结果被指定为 0 (没有染色) 至 4 (最强染色强度)。由独立观测者的结果计算 TMA 的每个核和每个肿瘤的平均得分强度。为了获得任何关系和相关性，将这些结果与临床病理学参数进行比较。

对每个 TMA 核中的 Glut-1 阳性率 (Glut-1 positivity) 的水平进行分析并指定得分为 0 至 4，该得分代表显示隔膜染色的肿瘤细胞的近似百分率 (0=未着色；1=0-5%阳性；2=5-15%阳性；3=15-30%阳性；4=>30%阳性)。由独立观测者的结果计算 TMA 的每个核和每个肿瘤的平均得分强度。为了获得任何关系和相关性，将这些结果与临床病理学参数进行比较。

正如 Santos 等所报道的[13,14]，对于每个核和肿瘤，采用 40 倍的放大率计算肿瘤细胞中 Ki67 阳性核的百分率，这些文献通过引用插入本

文。对每个核总共 200 个细胞进行计数，对每个肿瘤总共 800 个细胞进行计数，并且计算阳性百分率。由两名观测者进行独立评分。为了获得任何关系和相关性，将这些结果与临床病理学参数进行比较。

F. 统计学分析

NQO1 和 P450R 的表达与如下临床病理学参数进行比较：肿瘤阶段、肿瘤等级、肿瘤缺氧（Glut-1 表达）和繁殖。利用 11.0 版 SPSS 软件包（SPSS Inc., Chicago, IL）进行统计学分析。在免疫组织化学研究中，因为表达不是正态分布的，因此每个范围的平均表达数值被报道为具有四分位距（interquartiles）的中值。通过 Mann-Whitney U 测试确定独立变量之间的差异。在双尾分析（two-tailed analyses）中，P 值小于 0.05 被认为是显著的。

II. 结果

A. NQO1 蛋白质水平与肿瘤阶段和等级之间的关系

在所有病理等级和阶段的膀胱肿瘤的上皮细胞中，NQO1 在细胞质上定位，各个肿瘤之间 NQO1 的表达发生变化（图 1，表 1）。在许多情况下，在同一肿瘤中观察到不同的 NQO1 表达图案，其中高 NQO1 表达和低 NQO1 表达的区域在同一样品中（数据未示出）。NQO1 在所有病理阶段（pTa, pT1, \geq pT2）的肿瘤中表达，但是不同阶段的 NQO1 的表达水平发生变化（表 1）。在浅表性肿瘤（pTa + pT1）和肌层浸润性肿瘤（ \geq pT2）之间观察到 NQO1 表达的显著差异，其中，肌层浸润性肿瘤中的表达明显较小（ $P=0.02$ ）。通过非浸润性（pTa）和浸润性（pT1 + \geq pT2）肿瘤之间观察到的表达中的显著差异（ $P=0.03$ ）进一步证实 NQO1 表达与肿瘤浸润势的反比关系。TCC 的所有病理等级表达 NQO1（表 1）。与等级 1 或等级 3 相比，等级 2 肿瘤中的 NQO1 表达明显较高（表 1）。观察到高度分化（等级 1）和不利分化（等级 3）肿瘤之间没有显著差异（表 1）。

B. P450R 蛋白质表达与肿瘤阶段和等级之间的关系

所有被检测肿瘤表达在细胞质上定位具有可探测水平的 P450R。与 NQO1 相反，在肿瘤中的 P450R 表达通常是均匀的。图 1 中描述了典型的免疫染色。在 TCC 的所有阶段中 P450R 表达（表 1）。与浅表性（pTa + pT1）肿瘤相比，肌层浸润性肿瘤（ \geq pT2）中的 P450R 的水平明显更高（ $P < 0.01$ ）。与 NQO1 相反，P450R 的表达与渐增的肿瘤阶段呈正比关系，但与肿瘤的浸润势无关，由此明显可见，浸润性（pT1 + \geq pT2）和非浸润性（pTa）之间没有可观测的显著差异（表 1）。TCC 的所有病理等级都表达 P450R（表 1）。观察到 P450R 水平与渐增肿瘤等级之间呈正相关（表 1）。

C. Glut-1 与肿瘤阶段和等级之间的关系

每个肿瘤样本中和每个患者样品之间的 Glut-1 蛋白质的表达都是异质的。典型的免疫染色及其与肿瘤阶段和等级之间的关系分别表示在图 1 和表 1 中。Glut-1 蛋白质在所有被检测的阶段和等级中都表达，但是在 \geq pT2 肿瘤（相对于 pTa 肿瘤， $P = 0.05$ ）和等级 3 肿瘤（相对于等级 1 [$P = 0.03$] 和等级 2 [$P < 0.01$] 肿瘤二者）中的 Glut-1 的水平明显较高。另外，非浸润性（pTa）和浸润性（pT1 + \geq pT2）肿瘤之间在统计学上存在显著的差异（ $P = 0.02$ ），这暗示了浸润性疾病与较高的 Glut-1 蛋白质表达（因而缺氧水平较高）相关。

D. Ki67、肿瘤阶段、肿瘤等级和酶学之间的关系

Ki67 抗原的表达水平被用作肿瘤繁殖指数的指示剂（表 1）。正如所预期的，观察到渐增的肿瘤等级（递减的分化）和繁殖指数之间明显相关（ $P < 0.01$ ）。观察到肿瘤繁殖和肿瘤浸润势（pTa 对 pT1 + \geq pT2）之间没有关系。与此相反，相对于浅表性肿瘤（pTa + pT1 [$P < 0.01$])，肌层浸润性肿瘤（ \geq pT2）中的肿瘤繁殖明显更快，这可能是肌层浸润和较高肿瘤等级二者关系的结果。有趣的是，观察到肿瘤繁殖指数与 Glut-1 表达（ $P =$

0.01) 和 P450R 表达 ($P < 0.01$) 二者明显关联, 但与 NQO1 表达不相关。

这项研究结果表明, 涉及醌基化合物的生物还原活性和由 Glut-1 蛋白质水平所测定的缺氧的存在的关键酶的蛋白质表达随着膀胱 TCC 的阶段和等级改变。最惊人的观测结果是: NQO1 蛋白质表达随着渐增的肿瘤阶段明显降低 (表 1)。关于肿瘤等级, 也有证据表明, G3 肿瘤的 NQO1 水平比 G2 (而非 G1) 肿瘤要低。这些发现与先前公布的研究相符, 其中报道了 NQO1 mRNA 表达与渐增肿瘤阶段 (15) 之间呈反比关系。类似地, 对于 Glut-1, 蛋白质表达随着肿瘤等级 ($P = 0.03$ 和 <0.01 , 当 G1 和 G2 分别与 G3 肿瘤相比时) 和肿瘤阶段 ($P=0.05$, 当 pTa 肿瘤与 \geq pT2 肿瘤相比时) 增加, 这与先前的报道一致[16]。与先前公布的报道[15] (该报道表示与肌层浸润性 TCC 相比浅表性中的 P450R mRNA 的水平较高) 相反, 在这项研究中, P450R 蛋白质水平在肌层浸润性 (\geq pT2, 与 pTa + pT1 相比) 疾病中明显较高 ($P < 0.01$)。另外, P450R 蛋白质表达与渐增的肿瘤等级 (递减的分化) 呈正相关性 (表 1)。有趣的是, P450R 表达还表示与繁殖指数呈较强的正相关性 ($P < 0.01$), 这可能是 P450R、Ki67 和渐增的肿瘤等级 (递减的分化) 之间的较强关系的结果。然而, 当评估涉及 P450R 的生物还原疗法时应当记住这一点, 因为高繁殖指数表明与膀胱癌中的不良预后 (prognosis) 相关[17,18]。总的来说, 通过免疫组织化学对蛋白质表达的分析暗示了, 通过 Glut-1 表达所表明的缺氧与渐增的肿瘤阶段、等级和肿瘤浸润性相关。参考肿瘤酶学, 这项研究暗示了, NQO1 作为肿瘤阶段 (和浸润势) 的函数随着肿瘤阶段 (和浸润势) 渐增而明显降低, 而 P450R 水平随着肿瘤等级和浸润势增加。

这些发现对于在膀胱 TCC 的治疗中采用醌基生物还原药物的潜在治疗对策具有明显的意义。前期模型中存在的大量证据表明了, 细胞对 MMC、EO9 和 RH1 的应答不仅依赖于 NQO1 水平, 还依赖于肿瘤缺氧的水平。关于 MMC, NQO1 在有氧条件下测定细胞应答中的作用具有争议, 但是在缺氧条件下, 仅在具有低 NQO1 活性或不具有 NQO1 活性的细胞中见到活性明显增强[19]。在 EO9 和 RH1 的情况下, 类似的结果在缺氧

条件下得到，其中仅在具有低 NQO1 的细胞中观察到活性的明显增强[20,21]。然而，在有氧条件下，NQO1 活性和化学敏感性之间具有良好的相关性，这暗示了，在氧气的存在下，NQO1 在活化 EO9 和 RH1 中起主要作用[22,23]。用于解释这些观测结果的发生机制并不清楚[24]，但是在缺氧条件下，假定诸如 P450R 的单电子还原酶在生物还原活化过程中起到了更有影响的作用[25]。基于这些发现，诸如 EO9 和 RH1 的化合物以富 NQO1 肿瘤的有氧部分（同样可以为 MMC，但在较低程度上）为目标，或者以贫 NQO1 肿瘤的缺氧部分为目标，这些情况假定存在诸如 P450R 的单电子还原酶。因此，在富 NQO1 肿瘤的情况下，适当的是使用诸如 EO9 和 RH1 的化合物作为以需氧部分作为目标的单一试剂。对于具有明显缺氧部分的贫 NQO1 肿瘤，这些试剂应当与放射线疗法或以需氧部分为目标的化学治疗试剂组合使用。这项研究的结果暗示了，后种对策在更后期的膀胱 TCC（即 \geq T2）或更严重的疾病（即等级 3 肿瘤）的情况下是有效的，因为这些疾病通常具有低 NQO1 蛋白质表达（并且具有可能较高的 P450R 表达）并且包含明显的缺氧区域。在这种特定背景下，令人感兴趣的是，在肌层浸润性膀胱癌中，使用化学放射疗法（丝裂霉素 C 加上 5-氟脲嘧啶与根治性放射疗法组合）得到令人鼓舞的结果，但是对 NQO1 和缺氧标记的分析并未结合到本项研究的设计中[26]。在更广泛的背景下，在这项研究和其它研究中所表明的浅表性和肌层浸润性膀胱 TCC 具有显著的缺氧区域，这暗示了这些肿瘤是用于评估其它生物还原药物或缺氧介导疗法的效果的有利候选者。

总之，这项研究的结果表明了，涉及醌基化合物的生物还原活化和缺氧的存在关键酶的蛋白质表达作为膀胱 TCC 中的肿瘤阶段和等级的函数发生变化。这些结果暗示了，这些肿瘤（即 \geq T2 和 G3 肿瘤）对于与放射组合使用醌（例如 MMC、EO9 和 RH1）以缺氧部分作为目标的化学放射疗法方案来说是良好的候选者，或者对于以细胞的有氧部分作为目标的其它化学疗法来说也是良好的候选者。基于这些基本原理并参照图 1，案例 A（pT₂ G3）具有低 NQO1 水平、高 P450R 水平和高 Glut-1 水平，因而对于使用醌的化学辐射疗法来说是良好的候选者。案例 B（pTa G1）具有高

NQO1 水平、低 P450R 水平和中等 Glut-1 水平，因而应当对醌基化学疗法应答良好。案例 C (pT₁ G2) 具有中等 NQO1 水平、中等 P450R 水平和中等 Glut-1 水平，同样被预测对醌基化学疗法应答良好。对个体患者肿瘤采用这些标记绘图很重要，特别在考虑到患者之间存在显著不同（具体 NQO1 不同）。

正如本文所用，当采用酶水平来测定适用于患者的疗法时，可以通过如下方法来确定酶的高低水平：将相关肿瘤中所感兴趣酶的水平与同一患者的其它肿瘤相比，与其它患者的肿瘤相比和/或与标准肿瘤细胞系或其它本领域技术人员已知的其它可用参照点相比。因此，可以通过主治医师或对特定患者的肿瘤酶水平进行测量和/或定量中所涉及的其它实验室人员、研究人员或治疗人员来确定高低水平。

实施例 2

I. 材料和方法

A. 装置和通用化验原理

如图 2 所示，所述实验中所用的装置包括：转运孔插入物（Transwell insert, Costar），其被插入 24 孔培养板的一个孔中。插入物的底部中具有经胶原质涂敷的隔膜，因而在上室和下室之间形成了屏障以及细胞可以附着和生长的表面。这项研究中所用的细胞系是精选的 DLD-1 人结肠癌细胞，因为它能够在细胞之间形成紧密的连接，从而形成药物必须闯过的“屏障”。为了评估药物渗透性，将药物加入上室，并在时间间隔范围内测定下室中的药物浓度。

B. 细胞培养条件

DLD-1 细胞被常规保持在用 10%胎牛血清、丙酮酸钠（1 mM）、L-谷酰胺（2 mM）、青霉素/链霉素（50IU/ml, 50 μg/ml）补充、并用 HEPES（25 mM）缓冲的 RPMI1640 培养基中。将 DLD-1 细胞（ 2.5×10^5 个，在 200 μl 培养基中）加入上室，静置，并在富 CO₂（5%）的气氛中 37°C 下附着在隔膜上约 3 小时。在细胞附着上后，将转运孔插入 24 孔板

的一个孔中，并将 600 μl 培养基加入下室中。然后，将该装置在 37°C 下培养 4 天，其中上室和下室中的培养基每天变化。基于上述研究，培养 4 天后，多细胞层的厚度为约 50 μm 。对于每次化验，取出 3 个转运孔用于组织学检测以及厚度和完整性的精确测定（参见以下细节）。

C. 药物溶液的制备

如下所述以及图 3 所概述制备以下溶液。

1. 溶液 1：在 0.1% DMSO 中的 EO9 (347 μM)

将固体 EO9 溶于 100% DMSO 中以制成 347 mM 的原料液。将 10 μl 原料液加入 10 mL 全 PRMI 培养基中（无酚红）。为了防止 EO9 的可能沉淀，将 EO9 原料液加入培养基中时连续摇动。EO9 的最终浓度为 347 μM ，其相当于 4 mg/40 mL。

溶液 2：在 10% PG 中的 EO9 (347 μM)

将 200 毫克碳酸氢钠 (NaHCO_3) 溶于 4 mL EDTA 溶液 (0.5 mg/mL, 由 0.5M 原料液新制备, Sigma) 中。然后，将该溶液与 6 mL PG 溶液 (2 mL PG + 4 mL H_2O) 混合，从而制成总体积为 10 mL 含有 20% PG 的溶液。将该溶液加入含有 EO9 (2 mg)、碳酸氢钠 (5 mg) 和甘露醇 (12.5 mg) 的 20 mL 通用试管中。将该溶液在 37°C 下培养并连续摇动直到 EO9 完全溶解 (约 5-6 小时)。然后，该溶液用水以 1:1 进行稀释，从而得到 10% PG 溶液。

溶液 3：在 20% PG 中的 EO9 (347 μM)

将 200 毫克碳酸氢钠 (NaHCO_3) 溶于 4 mL EDTA 溶液 (0.5 mg/mL, 由 0.5M 原料液新制备, Sigma) 中。然后，将该溶液与 6 mL PG 溶液 (4 mL PG + 2 mL H_2O) 混合，从而制成总体积为 10 mL 含有 40% PG 的溶液。将该溶液加入含有 EO9 (2 mg)、碳酸氢钠 (5 mg) 和甘露醇 (12.5 mg) 的 20 mL 通用试管中。将该溶液在 37°C 下培养并连续摇动直到 EO9 完全溶解 (约 3-4 小时)。然后，该溶液用水以 1:1 进行稀释，从而得到 20% PG 溶液。

溶液 4：在 30% PG 中的 EO9 (347 μM)

将 200 毫克碳酸氢钠 (NaHCO_3) 溶于 4 mL EDTA 溶液 (0.5 mg/mL, 由 0.5M 原料液新制备, Sigma) 中。然后, 将该溶液与 6 mL PG 溶液 (6 mL PG+0 mL H_2O) 混合, 从而制成总体积为 10 mL 含有 60% PG 的溶液。将该溶液加入含有 EO9 (2 mg)、碳酸氢钠 (5 mg) 和甘露醇 (12.5 mg) 的 20 mL 通用试管中。将该溶液在 37°C 下培养并连续摇动直到 EO9 完全溶解 (约 2 小时)。然后, 该溶液用水以 1:1 进行稀释, 从而得到 30% PG 溶液。

D. 药物施予

在整个过程中, 除了使用无酚红培养基 (在色谱中酚红洗脱非常接近 EO9) 以外, 所用培养基如上所述。将 EO9 在 $t=0$ 时以 100 μl 的体积加入上室, 下室含有 600 μl 培养基 (恒速搅拌)。将转运孔在 37°C 下培养 10 分钟后取出, 并置于含有 600 μl 新鲜培养基的 24 孔板的一新孔中。将上室中的药物溶液取出并用 100 μl 新药物溶液替换 (即上室中的浓度被保持在恒定浓度)。在总共 1 小时的时间内每隔 10 分钟重复上述整个过程。

E. 萃取过程

EO9 立即采用 Isolute C18 SPE 药桶萃取。药桶中填装 1 mL 甲醇, 然后在添加样品 (500 μl) 前在 1 mL 去离子水中洗涤。在 1 mL 去离子水中进一步洗涤后, EO9 在 300 μl 甲醇中洗脱。将样品在真空 (在室温下旋转蒸发器中) 下干燥, 并储存在 -20°C 下直到需要分析, 或者在流动相 (如下) 中复原立即分析。

F. HPLC 分析

如 Philips 等所述对 EO9 实施色谱分析 (British Journal of Cancer. 65(3): 359-64, 1992), 该文献通过引用插入本文。简而言之, 使用 Hichrom RPB 柱 (25cm \times 4.6mm id, Hichrom Ltd, UK) 用于分离。使用具有 Masslynx 3.4 软件 (Micromass Ltd) 的 Waters 996 光电二极管阵列检测器 ($\lambda_1 = 280\text{nm}$) 对感兴趣的波峰进行光谱分析。移动相由 1 M 磷酸盐

缓冲液（1%）、甲醇（42%）和 HPLC 级水（47%）组成。流速利用 Waters Alliance 2690（Milford, MA, USA）四元梯度泵色谱系统设定为 1.2 ml 分钟⁻¹，该色谱系统还结合有自动取样器。检测极限为 10 ng/ml（34.7 nM）。

G.组织学

对于每个实验，选择 3 个转运孔插入物：1 个对照，2 个在实验末端。将每个转运孔固定在 10%福尔马林中 1 小时，然后转运到 70%乙醇中并储存整夜。使用清洁的解剖刀，将隔膜与塑料插入物仔细地分离，并利用本领域技术人员已知的标准过程进行处理以包埋在石蜡中。利用 Leitz Rotary Microtone 分割样本，并固定在经蛋白质涂敷的载玻片上，并采用本领域技术人员已知的标准过程利用苏木素和曙红染色。利用目镜分化板（eyepiece graticule）测量多细胞层的厚度，该目镜分化板已采用分级测微器（stage micrometer）校正过。对于每个部分得到 5 次测量结果，测量每个样品的三个部分。

II. 结果

A. 典型色谱图

图 4 表示掺入 WV14 作为内标的空白样品的色谱图（保留时间 = 11.059 分钟）。6.870 分钟处的峰为污染峰。图 5 表示 EO9 标准物（1 μg/ml（图 5A）和 20ng/ml（图 5B））在 RPMI1640 培养基中的色谱图。如图 5A 所示，EO9 和 WV14 峰分别在 8.029 分钟和 13.023 分钟洗脱（7.292 分钟处的波峰为上述污染峰）。应当注意到，由于实验室中温度波动保留时间会移动，但是相对保留时间应当保持恒定。图 5B 指出检测极限。图 6 表示 EO9 标准物在 0.1% DMSO 中（6A）；在 30%PG 中（图 6B）；在 20% PG 中（图 6C）和在 10% PG 中（图 6D）的色谱图。

B. 校正曲线

为每种 EO9 制剂制订校正曲线，结果在图 7 中表示。校正曲线是可重复的，并且如 7 中所示观察到每条校正曲线的斜率间的微小差异。上述差

异的原因不清楚，但可以反映不同制剂之间的萃取效率的微小差异。EO9 在 0.1%DMSO 中、10% PG 中、20% PG 中和 30% PG 中的萃取效率分别为 92.3%、81.7%、79.9%和 81.1%。因为这种变化，所以对每个所进行的实验制订校正曲线。在任意色谱图上没有见到明显分解的产物。

C. 药物渗透

如图 8 可见，随着 PG 浓度的增加，EO9 的多细胞层渗透速率降低。当上室中的浓度被保持在或多或少的恒定数值时，如所预料的，在 0.1% DMSO 中的 EO9 的动力学是线性的。在所测试 PG 的两个最高浓度下，应当注意到，动力学并未是完全线性的——随着时间的增加速率急剧增加。这个结果可能反映了 PG 诱导多细胞层的厚度发生变化（见图 9）。在任意评估时间点没有观察到明显的代谢物或分解产物。

图 9 表示用于检测 EO9 渗透穿过 DLD-1 多细胞层所进行的组织学分析结果。未经药物处理切片的厚度为 $56.01 \pm 3.63 \mu\text{m}$ 。采用在 0.1% DMSO 中的 EO9 处理 1 小时后，多细胞层的厚度 ($58.80 \pm 2.50 \mu\text{m}$) 与未经药物处理的样本相比没有显著差异。然而，采用在 30% PG 中的 EO9 处理后，多细胞层的厚度显著降至 $29.01 \pm 1.78 \mu\text{m}$ 。该层的外观中也存在明显的形态变化，最明显的是：该层外观本身出现“破裂”或“通道”。在整个实验中采用 PG 中的 EO9 得到的观测结果是：上室含有比预期更多的流体。例如，采用在 30%、20%和 10%PG 中的 EO9 培养 10 分钟后，从上室回收的体积分别为 106 ± 3 、 107 ± 3 和 $105 \pm 2 \mu\text{l}$ （暴露于在 0.1% DMSO 中的 EO9 1 小时后，回收的体积为 $98 \pm 2 \mu\text{l}$ ）。应当强调的是，这些体积仅是近似值（可以利用 Gilson 洗液管回收的体积），但是这些体积的确表明了，当使用溶于 PG 配制品（尤其在 30% PG 中）中的 EO9 时，上室中培养基的体积发生变化。还值得注意的是，组织学图片表明，在对照和经 EO（0.1% DMSO）处理的样本中，细胞与基质隔膜紧密接触，而对于采用在 30%PG 中的 EO9 处理的多细胞层，多细胞层与隔膜本身之间存在小但却明显的间隙。

参考文献:

1. Cancer Research UK, Bladder cancer - UK. London, 2002.
2. Tolley DA, Parmar MK, Grigor KM, et al. The effect of intravesical mitomycin C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: a further report with 7 years of follow up. *J Urol* 1996;155:1233-8.
3. Sartorelli AC, Hodnick WF, Belcourt MF, et al. Mitomycin C: a prototype bioreductive agent. *Oncol Res* 1994;6:501-8.
4. Ross D, Beall HD, Siegel D, Traver RD, Gustafson DL. Enzymology of bioreductive drug activation. *Br J Cancer* 1996;Suppl 27:S1-8.
5. Wardman P, Dennis MF, Everett SA, Patel KB, Stratford MR, Tracy M. Radicals from one-electron reduction of nitro compounds, aromatic N-oxides and quinones: the kinetic basis for hypoxia-selective, bioreductive drugs. *Biochem Soc Symp* 1995;61:171-94.
6. Workman P, Stratford IJ. The experimental development of bioreductive drugs and their role in cancer therapy. *Cancer Met Rev* 1993;12:73-82.
7. Puri R, Basu S, Loadman P, et al. Phase I clinical evaluation of intravesical EOquin (EO9) against superficial bladder cancer: Preliminary results. *Clinical Cancer Res* 2003;9:6248S-9S.
8. Danson S, Ward TH, Butler J, Ranson M. DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treat Rev* 2004;30:437-49.
9. Hoskin PJ, Sibtain A, Daley FM, Wilson GD. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Br J Cancer* 2003;89:1290-7.
10. Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer* 2003;104:85-91.
11. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001;195: 72-9.

12. Basu S, Brown JE, Flannigan GM, et al. Immunohistochemical analysis of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and NADPH cytochrome P450 reductase in human superficial bladder tumors: relationship between tumor enzymology and clinical outcome following intravesical mitomycin C therapy. *Int J Cancer* 2004;109:703-9.

13. Santos L, Amaro T, Costa C, et al. Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification. *Int J Cancer* 2003;105: 267-72.

14. Santos LL, Amaro T, Pereira SA, et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:74-80.

15. Li D, Gan Y, Wientjes MG, Badalament RA, Au JL. Distribution of DT-diaphorase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: cytochrome p450 oxidoreductase in bladder tissues and tumors. *J Urol* 2001;166:2500-5.

16. Chang S, Lee S, Lee C, Kim JI, Kim Y. Expression of the human erythrocyte glucose transporter in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2000;55:448-52.

17. Blanchet PDS, Eschwege P, Viellefond A, et al. Prospective evaluation of Ki-67 labeling in predicting the recurrence and progression of superficial bladder transitional cell carcinoma. *Eur Urology* 2001;40:169-75.

18. Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP. MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer* 2000;88:2598-605.

19. Plumb JA, Workman P. Unusually marked hypoxic sensitization to indoloquinone EO9 and mitomycin C in a human colon-tumor cell line that lacks DT-diaphorase activity. *Int J Cancer* 1994;56:134-9.

20. Plumb JA, Gerritsen M, Workman P. DT-diaphorase protects cells from the hypoxic cytotoxicity of indoloquinone EO9. *Br J Cancer* 1994;70:1136-43.

21. Kim JY, Patterson AV, Stratford IJ, Hendry JH. The importance of DT-diaphorase and hypoxia in the cytotoxicity of RH1 in human breast and non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Drugs* 2004;15:71-7.

22. Fitzsimmons SA, Workman P, Grever M, Paull K, Camalier R, Lewis AD. Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor cell line panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:259-69.

23. Dehn DL, Winski SL, Ross D. Development of a new isogenic cell-xenograft system for evaluation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-directed antitumor quinones: evaluation of the activity of RH1. *Clinical Cancer Res* 2004;10:3147-55.

24. Workman P. Enzyme-directed bioreductive drug development revisited: a commentary on recent progress and future prospects with emphasis on quinone anticancer agents and quinone metabolizing enzymes, particularly DT-diaphorase. *Oncol Res* 1994;6:461-75.

25. Belcourt MF, Hodnick WF, Rockwell S, Sartorelli AC. Differential toxicity of mitomycin C and porfiromycin to aerobic and hypoxic Chinese hamster ovary cells overexpressing human NADPH:cytochrome c (P-450) reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:456-60.

26. Hussain SA, Stocken DD, Peake DR, et al. Long-term results of a phase II study of synchronous chemoradiotherapy in advanced muscle invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 2004;90:2106-11.

表 1. 人体膀胱 TCC 中的 NQO1、P450R、GLUT-1 和 Ki67 的蛋白质表达。 NQO1、P450R 和 GLUT-1 的数据被表示为两名观测者的中值评分 (\pm 四分位距)。繁殖指数的数据被表示为两名观测者的平均值 \pm S.E。正如“材料和方法”中所述, 样本的 NQO1、P450R 和 GLUT-1 被评为 0 至 4, 繁殖指数被计算为 Ki67 阳性率%。

	样品数	中值 NQO1 表达(\pm 四分 位距)	中值 P450R 表达 (\pm 四分位距)	中值 GLUT-1 表达 (\pm 四分位距)	繁殖% (Ki67 阳性率) (\pm S.E.)
pTa	19	2.50 (1.14- 3.20)	3.20 (2.58-3.83)	2.00 (1.30-3.80)	16.75 \pm 2.8
pT ₁	19	1.88 (0.33- 3.00)	2.96 (2.33-3.67)	3.38 (2.75-3.88)	13.88 \pm 2.2
pT ₂	14	0.17 (0.00- 1.67)	3.89 (3.75-3.92)	3.88 (2.67-4.00)	24.59 \pm 4.43
G1	11	1.00 (0.00- 1.10)	2.79 (2.17-2.92)	2.38 (2.00-3.25)	9.72 \pm 2.64
G2	26	2.72 (1.83- 3.20)	3.35 (2.75-3.83)	2.83 (1.75-3.75)	14.59 \pm 1.72
G3	15	0.33 (0.00- 1.85)	3.83 (3.31-3.92)	4.00 (3.63-4.00)	30.47 \pm 3.71
非浸润性 ^a	19	2.50 (1.14- 3.20)	3.20 (2.58-3.83)	2.00 (1.31-3.67)	17.51 \pm 2.83
浸润性 ^b	33	1.67 (0.0- 2.52)	3.67 (2.92-3.89)	3.50 (2.71-4.00)	19.41 \pm 2.86

浅表性 ^c	38	2.00 (1.08-3.17)	3.10 (2.33-3.78)	2.83 (1.83-3.83)	15.69 ± 1.79
肌层浸润性 ^d	14	0.17 (0.00-1.67)	3.89 (3.75-3.92)	3.88 (2.67-4.00)	24.59 ± 4.43

后缀 a、b、c 和 d 分别表示 pTa、(pT₁ + pT₂)、(pTa + pT₁)和 pT₂ 肿瘤阶段。

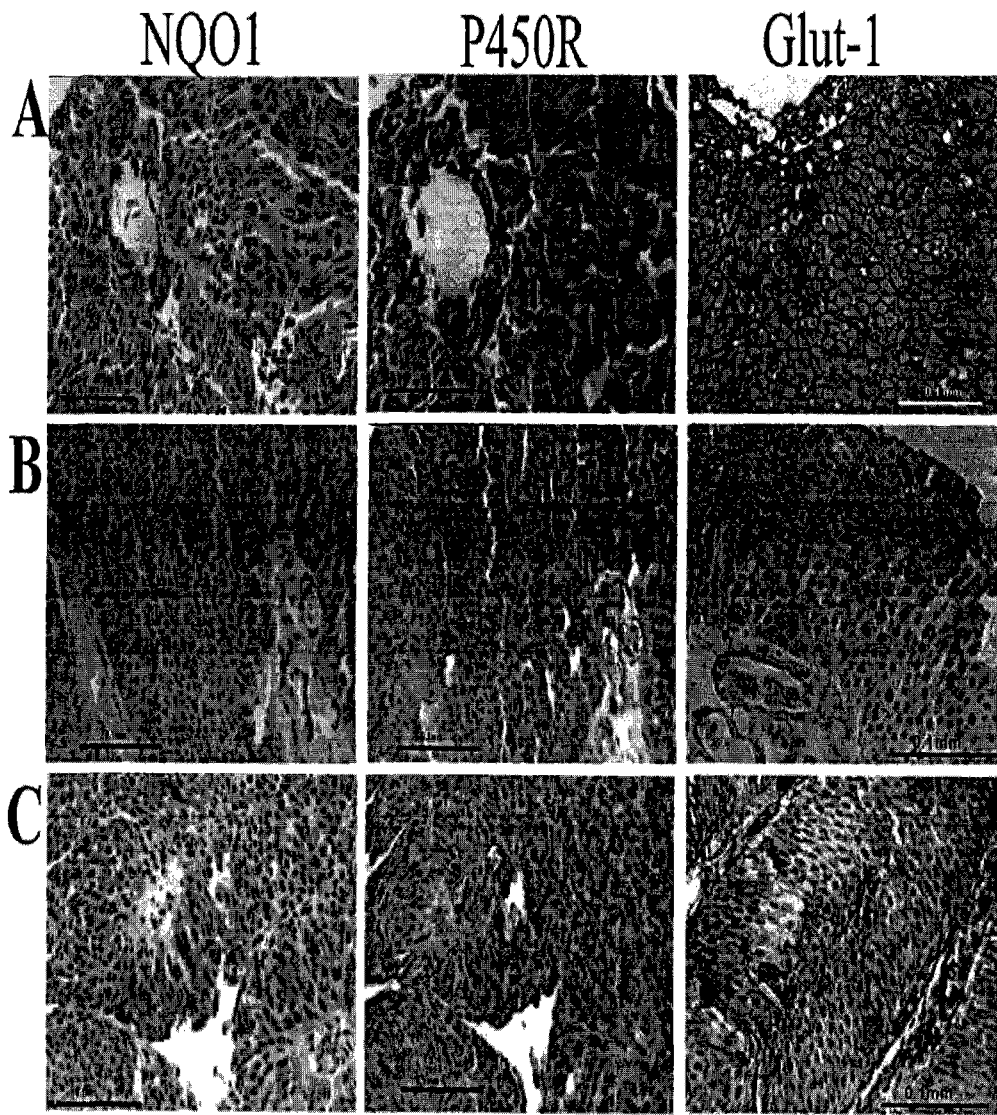


图1

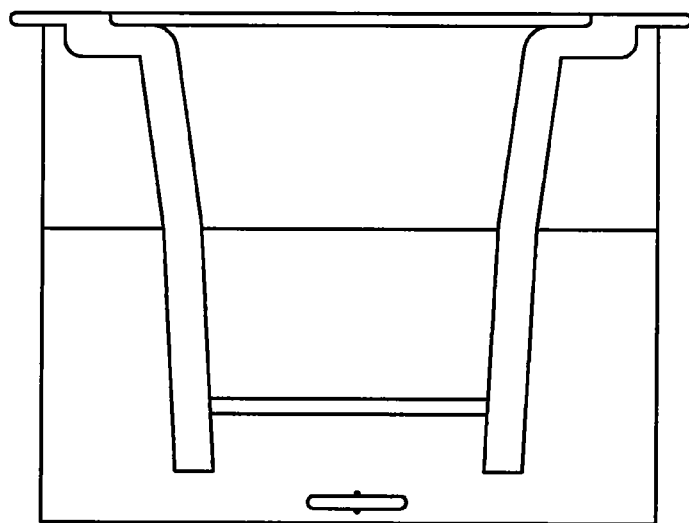
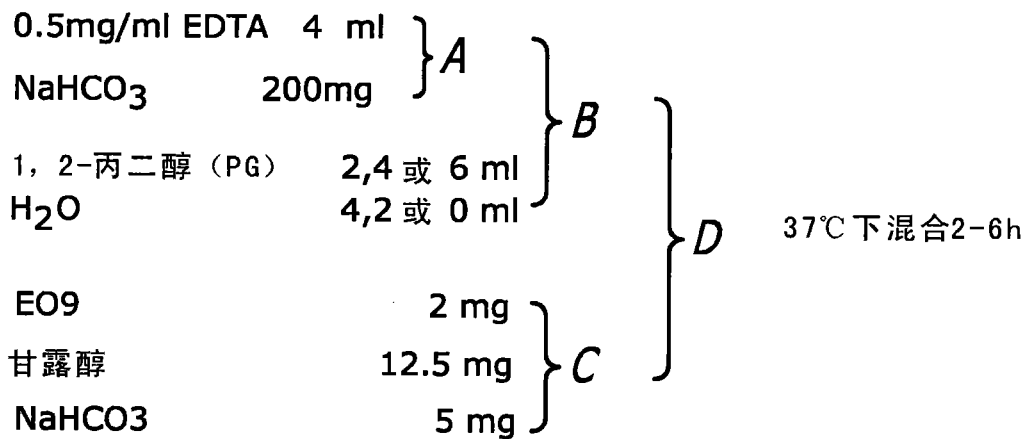


图2



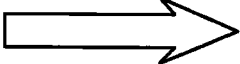
混合物D+WF I 1:1  待用

图3

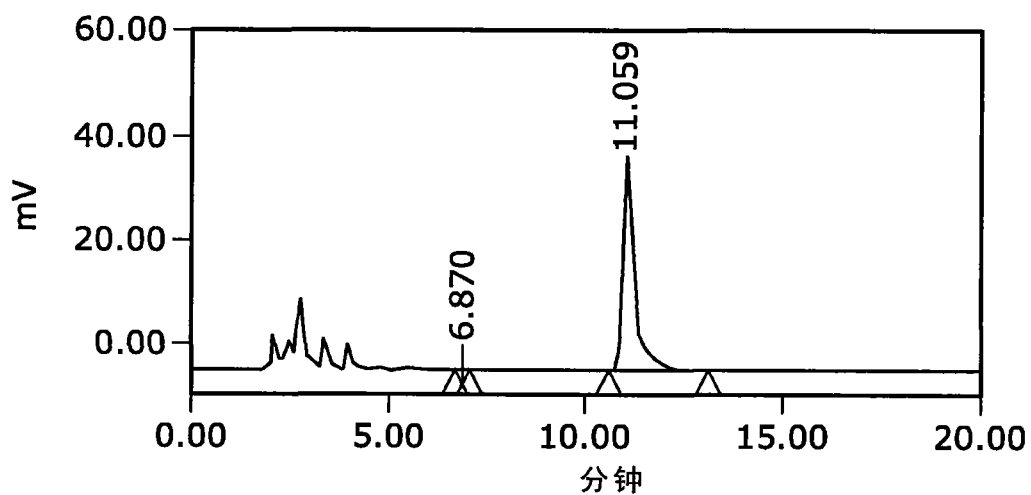


图4

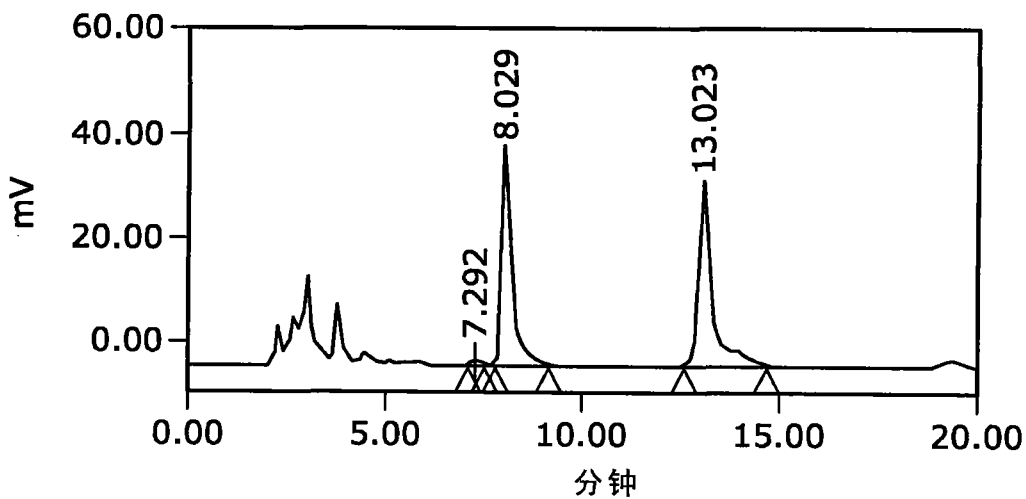


图5A

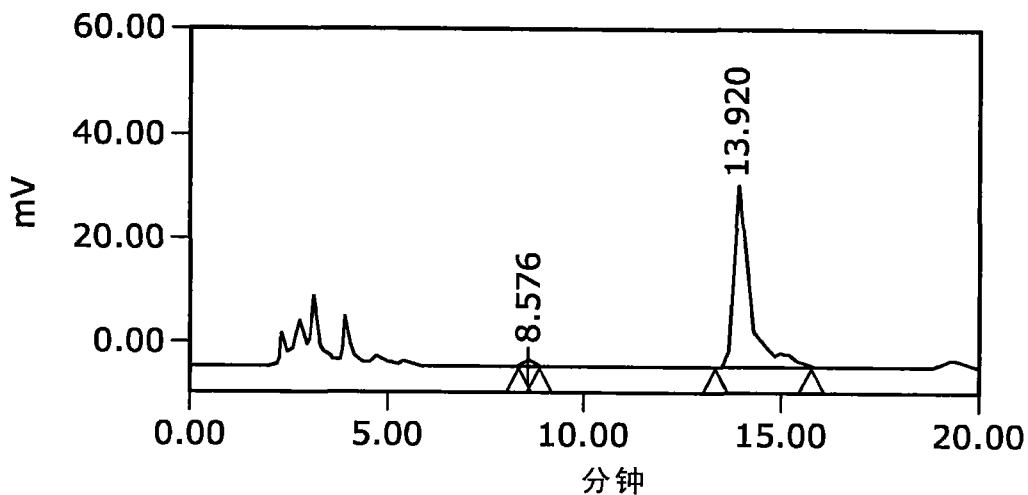


图5B

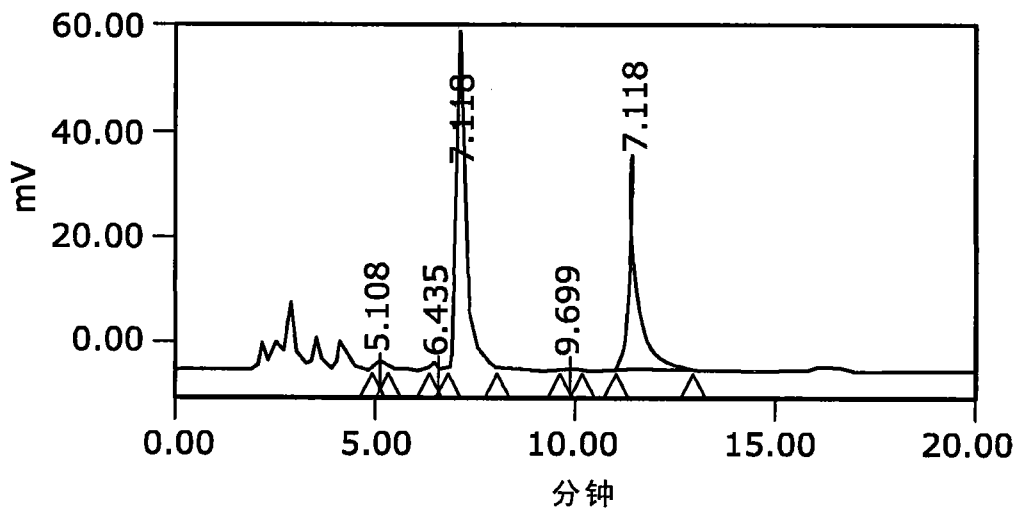


图6A

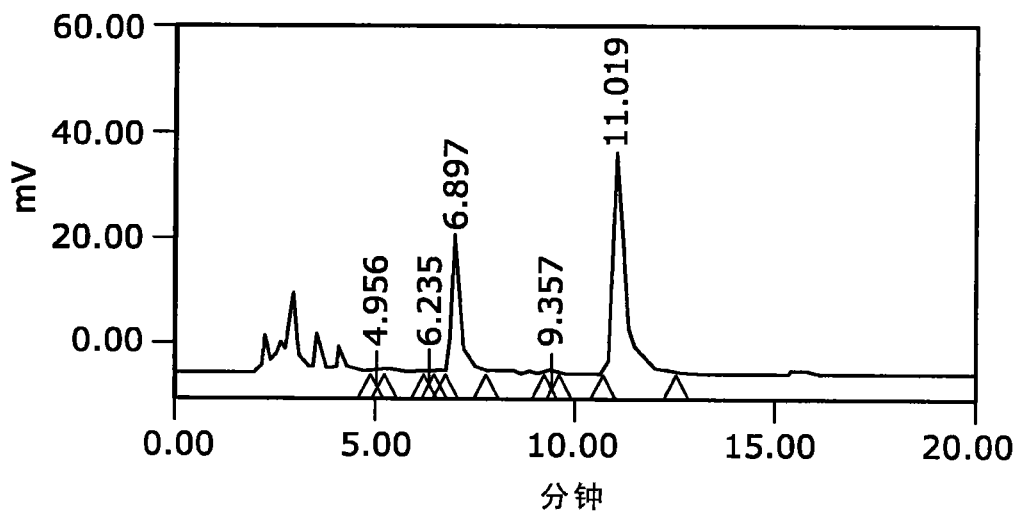


图6B

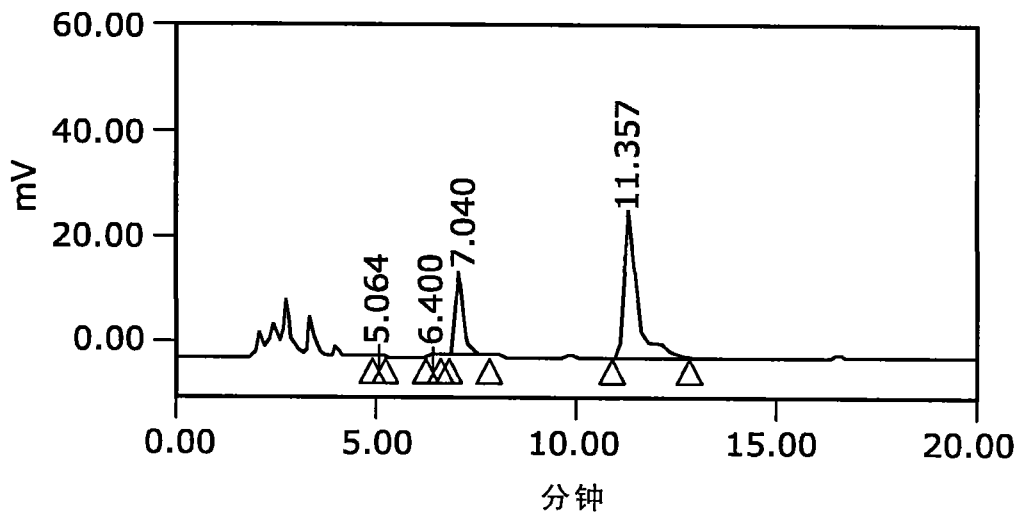


图6C

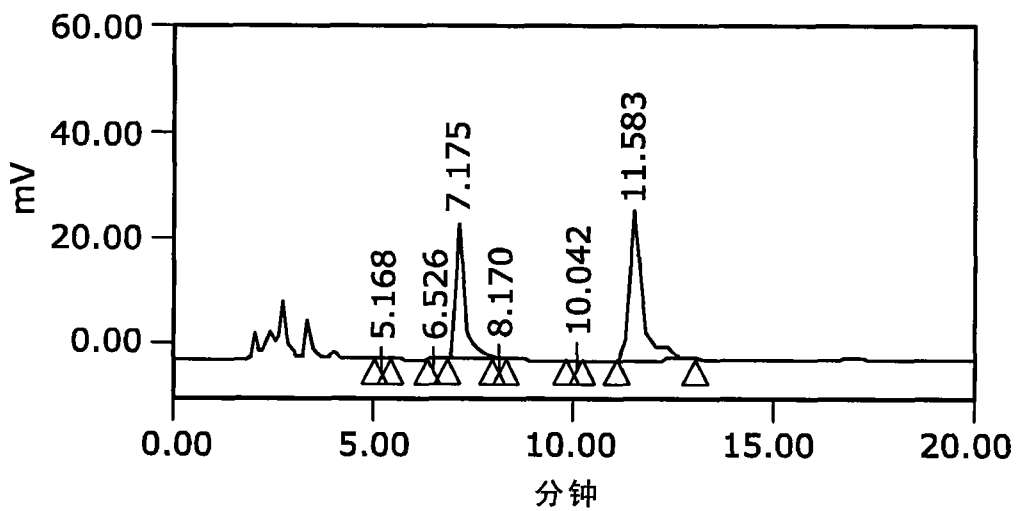


图6D

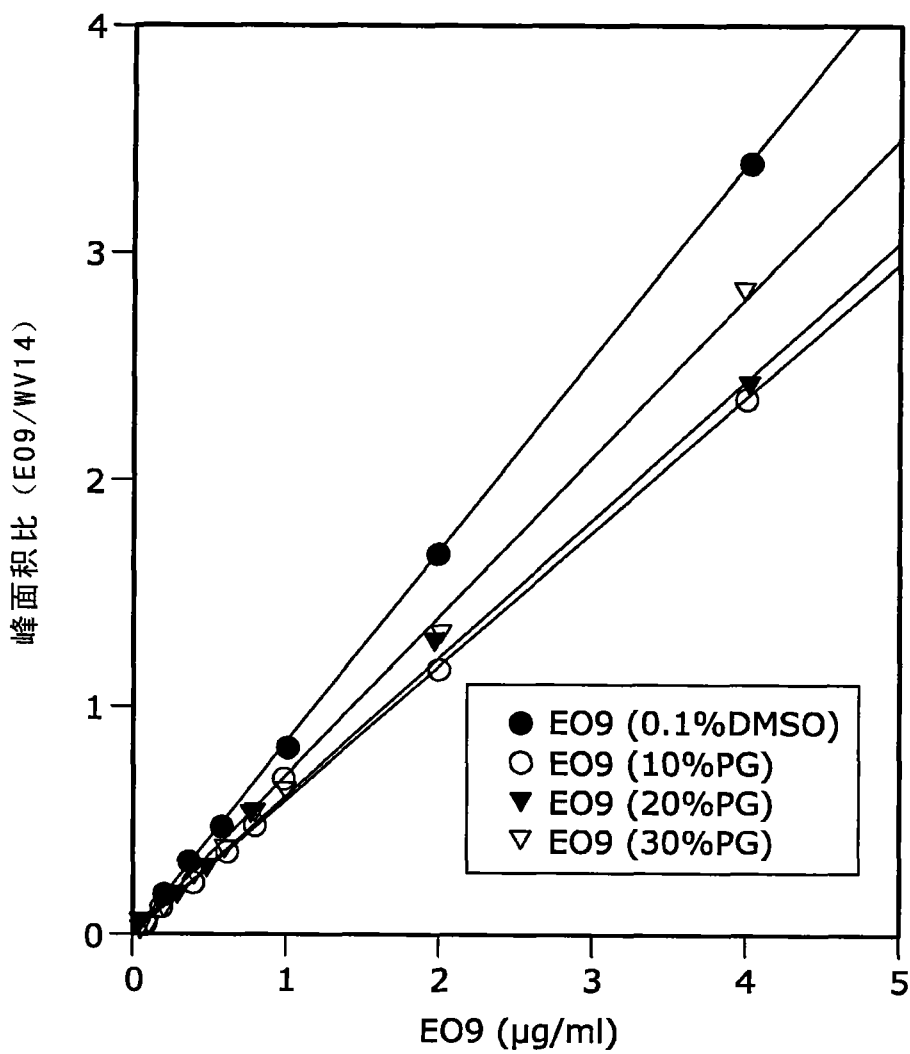


图7

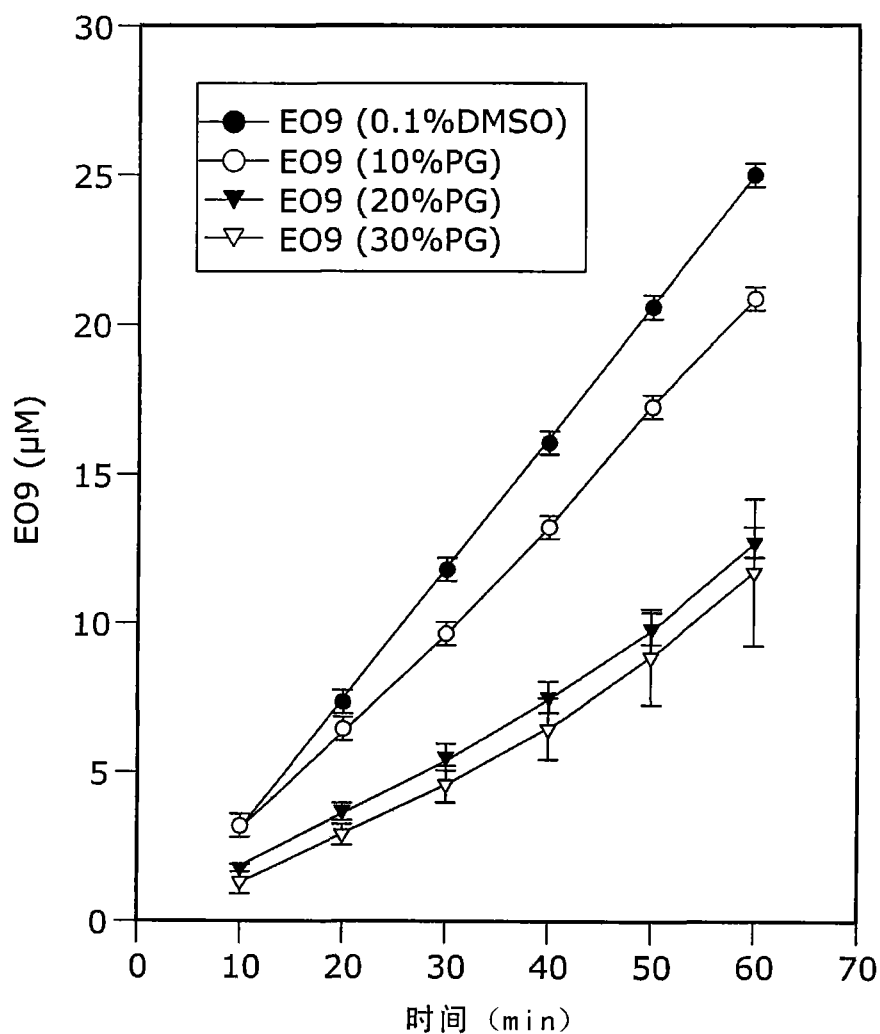
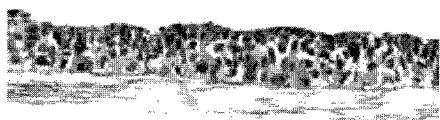
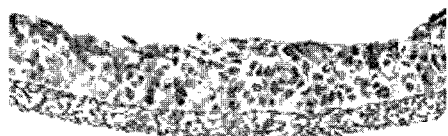


图8



未经药物处理的对照：
MCL的厚度=56.01±3.63 μm



采用0.1%DMSO中的EO9处理1小时后的
MCL: MCL的厚度=58.80±2.50 μm



采用30%PG中的EO9处理1小时后的MCL：
MCL的厚度=29.01±1.78 μm

图9