

血管内皮抑素对小鼠肺癌影响的研究

汪力慧

摘要:目的 观察血管内皮抑素(Endostatin)对小鼠体内 Lewis 肺癌生长、血管生成及转移的影响。方法 将荷 Lewis 肺癌的 C57 鼠进行不同剂量组的内皮抑素血管内皮抑素和顺铂干预,观察肿瘤生长、移植瘤及转移瘤体内的微血管密度(MVD)的表达及转移发生率,采用 SPSS19.0 进行统计学分析。结果 血管内皮抑素对鼠 Lewis 肺癌的生长有明显的抑制作用,并能显著下调移植瘤及转移瘤内微血管密度,减少肿瘤肺转移率,其作用程度与内皮抑素剂量呈现明显正相关,且血管内皮抑素中未见获得性耐药现象发生。结论 血管内皮抑素可以通过下调肿瘤组织中的 MVD,抑制肿瘤生长及减少转移的发生,不会诱发肿瘤对化疗药物的耐药现象发生,值得在抗癌治疗中使用。

关键词: 血管内皮抑素(Endostatin) 微血管密度(MVD) 凋亡

中图分类号 R734.2 文献标识码 A 文章编号 1009-9727(2012)10-1182-03

Study of anti-angiogenetic and anti-metastatic effect of Endostatin on Lewis lung carcinoma xenograft in mice . WANG Li-hui.(Port Hospital in Qinhuangdao City,Qin huangdao 066003 Hebei, P.R.China)

Abstract:Objective To investigate the anti-tumor, anti-angiogenetic and anti-metastatic effects of endostatin on lewis lung carcinoma xenograft in mice. **Methods** Different doses of Endostatin and Cisplatin were given to C57 mice burdened Lewis lung carcinoma xenograft, then tumor growth, MVD both in planted xenograft tumor and metastatic tumor in lungs and metastases rate were observed and analyzed statistically. **Results** Endostatin inhibited tumor growth down-regulated MVD both in planted xenograft tumor and metastatic tumor in lungs and metastases rate, dose-dependent effect was observed in some degree. **Conclusion** Endostatin could inhibit the growth and metastases of Lewis lung carcinoma through down-regulating MVD both in planted xenograft tumor and metastatic tumor in lungs, Worthy to use in the treatment of cancer.

Key words: Endostatin MVD apoptosis

近年,非小细胞肺癌(NSCLC)的发病率逐年上升,已排在恶性肿瘤首位,占大城市癌症发病率和死亡率的首位。化疗是肺癌的主要治疗手段,能够缩小肿瘤体积,降低临床分期,但多种方法治疗后仍难避免复发、进展,多药耐药现象的产生是影响 NSCLC 化疗效果的主要原因。肿瘤血管生成是肿瘤生长和转移的形态学基础,抗血管生成靶向药物毒性小、不易产生耐药,能够安全、有效切断肿瘤生长和转移所依赖的命脉,已成为当今肿瘤治疗领域研究的热点之一。本文笔者采用荷 Lewis 肺癌小鼠模型,观察了内源性抗血管生成因子血管内皮抑素对肿瘤生长及转移的影响,现将结果分析如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 5 周龄健康清洁级 C57(北京维通利华公司)小鼠 65 只,体重(18±2)g。

1.1.2 药物及试剂 重组人血管内皮抑制素注射液(Endostatin),来自天津医科大学临床药理实验基地惠赠,15mg/只;顺铂,购自南京制药厂,20mg/只。Anti VEGF(C-1) Antibody 单克隆,血小板内皮细胞粘附分子(PECAM-1)购自天津市灏洋生物制品科技有限

公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用 DME M 培养基与 10% 胎牛血清作为培养基,置于 37℃、5% CO₂ 的孵育箱内培养 Lewis 肺癌细胞系。

1.2.2 实验分组 将 C57 小鼠按随机数字表分为 6 组,每组 10 只,另 5 只小鼠不接种肿瘤、以便取其肺组织作为正常对照组。将 Lewis 肺癌细胞制成单细胞悬液注射并注射 0.1ml 于小鼠的左腋下,两周后第 1~6 组荷瘤鼠分别皮下注射为不同剂量药物:Endostatin 400μg/(d. 只)、Endostatin 300μg/(d. 只)、Endostatin 200μg/(d. 只)、Endostatin 200μg+顺铂 40μg/(d. 只)、顺铂 40μg/(d. 只)、注射用水 0.1ml/(d. 只),每组均注射 10d。

1.2.3 肿瘤生长曲线的绘制 给药后每周用游标卡尺测肿瘤最大层面处的最长径和最短径,绘制肿瘤生长曲线。

1.2.4 免疫组织化学染色(MVD) 10% 甲醛固定肿瘤和肺的标本 24h 后,石蜡包埋连续切片 4 张,每张厚 4mm,1 张作 HE 染色,核实组织病理学诊断,另两张按免疫组化试剂盒说明书作做 MVD 染色进行免疫组化检查,其余备用。微血管密度 MVD 计数方法参考

作者单位 秦皇岛市港口医院 河北 秦皇岛 066003

作者简介 汪力慧(1975~),女,汉族,江苏省,副主任医师,硕士,研究方向 肿瘤化疗和生物治疗。

文献标准^[1]。

1.2.5 流式细胞技术检测细胞凋亡和P170含量 取5瓶生长旺盛的Lewis肺癌细胞,并进行编号,每瓶底面积已铺满80%以上生长状态好且处于对数生长期的肿瘤细胞,去掉原培养液,加入新鲜细胞培养液每瓶5ml,分别往第1~5瓶加入药物为①高浓度血管内皮抑素组(15 μ g);②中浓度血管内皮抑素组(12 μ g);③低浓度血管内皮抑素组(8 μ g);④对照组(DMSO100ul);⑤对照组:培养基,作用24h后,应用流式细胞仪测定凋亡细胞比例。

1.3 统计学分析 采用SPSS19.0统计软件进行分析,抑瘤率采用公式=(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重,各组平均瘤重、微血管密度比较采用方差分析进行分析,肿瘤转移率比较采用Fisher确切概率法检验。

2 结果

2.1 Endostatin对荷瘤C57鼠肿瘤的作用 血管内皮抑素对荷瘤C57鼠肿瘤平均直径呈现明显剂量-效应关系和时间-效应关系,顺铂联合Endostatin作用于荷瘤C57鼠肿瘤平均直径呈现明显的时间-效应关系,对照组肿瘤平均直径明显大于各实验组,肿瘤生长曲线见图1。

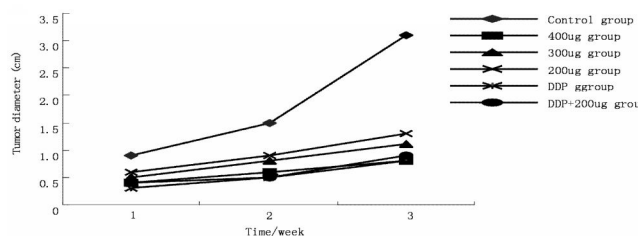


图1 肿瘤生长曲线

Fig 1 tumor growth curve

2.2 抑瘤率 DDP组抑瘤率为 0.98 ± 0.01 , 400 μ g血管内皮抑素为 0.93 ± 0.04 , 300 μ g血管内皮抑素为 0.94 ± 0.07 , 200 μ g+DDP组为 0.92 ± 0.08 , 200 μ g组为 0.81 ± 0.08 , DDP组与其它各组有差异 $P < 0.05$ 。

2.3 抗肿瘤转移作用 Endostatin处理组(内含400 μ g、300 μ g、200 μ g和200 μ g+DDP组)平均肺转移率为37.5%,模型组转移率为80%,Endostatin处理组明显低于模型组($P = 0.0303$),DDP单独处理组和模型组转移率间的差异无统计学意义($P = 0.3498$)。

2.4 对MVD的影响 对原位移植瘤组织中MVD的影响比较,400 μ g、300 μ g < 200 μ g+DDP组 < 200 μ g组 < DDP组 < 模型组, 400 μ g、300 μ g 肿瘤微血管密度差异不明显。对肺转移处肿瘤(转移肿瘤)组织中MVD的影响比较为400 μ g、300 μ g和200 μ g组 < 200 μ g+DDP组 < DDP组 < 模型组, 400 μ g、300 μ g和200 μ g组肺转移瘤

组织微血管密度差异不明显;原位移植瘤MVD与肺转移肿瘤组织中MVD表达间呈正相关($r = 0.97673$, $P = 0.0008$) 结果见图2。

表1 各组肺转移数(只)及转移率

Table 1 The number and rate of lung metastases in each group

| 组别 Group | 肺转移 Lung metastasis | 非肺转移 Non-lung metastasis | 比例 The ratio | 百分率 Transfer rate(%) |
|--|---------------------|--------------------------|--------------|----------------------|
| 对照组 Control group | 8 | 2 | 8/10 | 80.00 |
| 400 μ g组 Endo400 μ g | 2 | 8 | 2/10 | |
| 300 μ g组 Endo300 μ g | 4 | 6 | 4/10 | 37.5 |
| 200 μ g组 Endo200 μ g | 5 | 5 | 5/10 | |
| 200 μ g + DDP组 Endo200 μ g + DDP | 4 | 6 | 4/10 | |
| DDP组 | 5 | 5 | 5/10 | 50.00 |

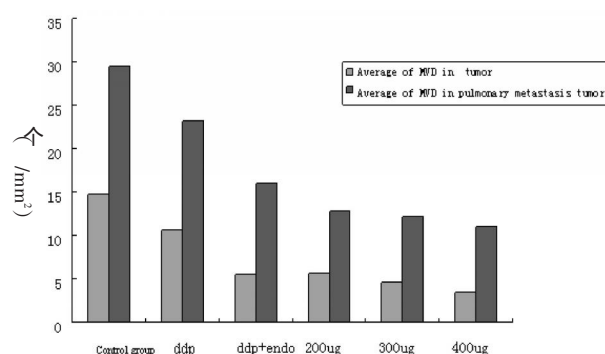


图2 不同处理方法对原位移植瘤和肺转移瘤中MVD的影响

Fig 2 Effect of different treatment on orthotopic transplanted tumor and MVD of lung metastasis tumor

2.5 血管内皮抑素对Lewis肺癌细胞系凋亡比例 血管内皮抑素不同浓度的Lewis肺癌细胞系凋亡比例分别为:15 μ g组为33.2%, 12 μ g组为11.5%, 8 μ g组为3.82%, 对照组为1.12%, 二甲基亚砜组为1.77%。

2.6 P170的检测结果 采用流式细胞技术检测P170, 15 μ g、12 μ g、8 μ g组、对照组和二甲基亚砜组的P170结果结果见表2,表明血管内皮抑素中未见获得性耐药现象发生,提示其不会诱发肿瘤对化疗药物的抗拒,临床上应用血管内皮抑素与化疗联合治疗具有可行性。

3 讨论

恶性肿瘤具有无限制浸润性生长和远处转移两大特征,血管生成在参与肿瘤浸润生长与转移发挥重要作用,抑制血管生成能够给抑制体内外血管生成,

从而抑制肿瘤生长 ,在肿瘤治疗领域中有广阔的前景 ,在众多血管生长抑制因子中 ,其中新型人血管内皮抑素血管内皮抑素(Endostatin)抑制血管新生和抗肿瘤作用最为明显^[2-5]。Endostatin是由鼠内皮细胞瘤(EOMA)培养液中分离出分子量为20KD、由184个氨基酸残基构成的内源性的血管生成抑制剂^[6]。胶原蛋白 XVIII 的NCI结构域通过蛋白水解可裂解出Endostatin ,Endostatin是内源胶原蛋白XIII的C末端的非胶原区(NCI) ,一般不引起免疫反应^[7]。

表2 各组耐药蛋白P170检测结果(%)

| Table 2 Result of P170 | | |
|------------------------|--------------------|-------------|
| 组别 Group | 空白对照 Control group | 实验结果 Result |
| 15μg/ml 组(group) | 1.38 | 8.66 |
| 12μg/ml 组(group) | 1.98 | 14.8 |
| 8μg/ml 组(group) | 1.09 | 4.08 |
| demso 组(group) | 1.73 | 16.5 |
| 对照组 Control | 1.31 | 4.98 |

Endostatin能够强大的特异性抑制血管内皮细胞增殖的作用 ,并且特异性地靶向作用于增生的内皮细胞 ,达到抑制内皮细胞增生和迁移、拮抗肿瘤新生血管生成、阻断肿瘤血液供应 ,起到抑制肿瘤生长而使其进入 休眠状态 并导致凋亡 ,且不会诱发骨髓抑制和胃肠道反应等化疗药物所常表现出的不良反应^[8-11]。

国内、外研究表明 ,MVD 是肿瘤发生转移的危险因素 ,本文结果显示 ,血管内皮抑素能够降低肿瘤MVD ,且其效果与剂量呈正比 ,但是化疗药物顺铂抑制肿瘤MVD作用微弱 ,说明Endostatin可以使原发及转移肿瘤灶MVD减少 ,其变化情况与VEGF一致 ,血管内皮抑素对MVD作用是全身性的。同时通过Endostatin对原位移植肿瘤的生长和转移发生的影响结果表明 ,Endostatin有抑制(预防)肿瘤转移的作用 ,且作用优于顺铂 ,但作用不如化疗药物Cisplatin强烈 ,表明Endostatin对已形成的瘤体难以达到明显的疗效。

肿瘤细胞耐药是严重影响肿瘤患者化疗疗效及临床预后的关键原因之一 ,其耐药机制可能为细胞泵出化疗药物使细胞内药物浓度降低 ,或增强肿瘤细胞自我修复药物引起损伤的活性 ,或抗凋亡机制^[12-13]。多药耐药MDR (Multidrug Resistance)是目前临床研究最热门的方向 ,它是由7号染色体92L1的MDR1基因介导的跨膜糖蛋白 ,在正常骨髓细胞、粒和单核细胞均有一定量的表达 ,但在粒和单核细胞中表达较低^[14-15]。P170是一类多向性的膜转运蛋白 ,与部分抗肿瘤药物有较强亲和力 ,从而将细胞内的化疗药物泵

出 ,降低细胞内药物浓度导致耐药。本文结果显示 ,血管内皮抑素不会诱发肿瘤对化疗药物的抗拒。

综上所述 ,Endostatin可直接作用于内皮细胞而使MVD下降而减少肺转移的发生 ,并提示在血管内皮抑素中未见获得性耐药现象发生 ,有必要做更多的研究阐明其抗肿瘤效应的潜在临床意义。

参考文献 :

[1] SunY,Zhou JC.Manual of Medical Oncology People's Medical Publishing House,2003:591-595(In Chinese)
(孙燕 ,周际昌.临床肿瘤内科手册.北京 :人民卫生出版社 ,2003:591-595.)

[2] Folkman J . Antiangiogenic gene therapy[J] . Proc Natl Acad Sci . USA . 1 999 ,95(1 6) :6945-6952 .

[3] Kong HL ,Crystal RG .Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis[J].JNatl Cancer Inst . 1 999 ,90(4) :273-296 .

[4] CaoY . Endogenous angiogenesis inhibitors :angiostatin ,endostatin , and other proteolytic fragments[J] . Prog Mol Subcell . Bi01 . 1999 . 20 :161-176 .

[5] Reilly M S ,Boehm T ,Shing Y ,et al . Endostatin :An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J] . Cell ,1 997 ,99(2) :277-295 .

[6] Hanahan D ,Folkman J . Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J] . Cell ,1996 ,86 :353-364 .

[7] Taddei L ,Chiarugi P ,Brogelli L ,et al . Inhibitory effect of full-length human Endostatin on in vitro angiogenesis[J] . Biochem Biophys Res Commun ,1999 ,263(2) :340-345 .

[8] Luo X ,Slater JM ,Gridley DS . Enhancement of radiation effects by PX-LG-mEndo in a lung Cacinoma model[J] . Int J Radiat Oncol Biol Phys . 2005 ,Oct ;63(2) :651-654 .

[9] lement G ,Baruchel S ,Rak J ,et al.Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity[J] . Clin . Investig . ,2000 ,105 :R15 . R24 .

[10] Carmeliet P ,Luttun A . The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in(therapeutic)angiogenesis[J] . Thromb Haemost , 2001 ,86 :289-297 .

[11] Hanna NN ,SeetharaITl S ,Mauceri HJ ,et al . Antitumor interaction of short-course endostatin and ionizing radiation[J] . Cancer J . 2000 ,6(5):293-297 .

[12] Fox M , Roberts J . Drag resistance and DNA repair[J] . Cancer MetastasisRev . ,1 987 ,6 :261-268

[13] Scheffer GL ,Wijngaard PL ,Flens MJ ,et al . The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein[J] . Nat Med . 1 995 :1 578-5820

[14] Lum BL ,Gosland MP . MDR expression in normal tissues[J] . HematoI / Oncol Clinics ofNorth America ,1995 ,9 :319-336 .

[15] Schuch G ,Kisker O ,Atala A ,et al . Pancreatic tumor growth is regulated by the balance between positive and negative modulators of angiogenesis[J] . Angiogenesis . 2002 ,5(3) :1 81-190 .

收稿日期 2012-03-05 编辑 符式刚