

文章编号:1005-6947(2004)04-0268-04

· 实验研究 ·

重组人内皮抑素对裸鼠胃癌瘤株生长的影响

王天宝¹, 吴小鹏², 张维东³, 李兆亭²

(1. 中山大学附属第一医院 胃肠胰腺外科, 广东 广州 510080; 2. 山东大学齐鲁医院 普外科, 山东 济南 250012; 3. 山东省医学科学院 病理科, 山东 济南 250012)

摘要:目的 探讨重组人内皮抑素(rhES)对胃癌裸鼠瘤株生长的影响。方法 随机将12只胃癌荷瘤裸鼠分为实验组与对照组。对照组瘤周注射生理盐水0.1ml,实验组瘤周注射rhES 2mg/kg,1次/d,连用10d。自用药开始,每5d测量肿瘤体积,直至用药结束后5d,检测肿瘤组织VEGF, bFGF, PDGF, VEGF-c, VEGFR-3, F VIII Ag, PCNA 和 bcl-2 及肿瘤细胞凋亡指数(AI);计算抑瘤率,肿瘤缩小率;分析对照组与实验组AI,肿瘤体积及微血管密度以及实验组治疗前后肿瘤体积差异的显著性。结果 用药前实验组肿瘤体积与对照组差别无统计学意义。用药后实验组肿瘤体积迅速减小;用药后5d肿瘤体积与对照组相比明显缩小($P=0.0001$)。实验组肿瘤用药后较用药前明显缩小($P=0.0015$)。抑瘤率为91.2%,肿瘤缩小率为53.5%。实验组VEGF, bFGF, VEGF-c, VEGFR-3, bcl-2 及PDGF表达强度均低于对照组;实验组AI高于对照组相($P=0.0000$);MVD低于对照组相($P=0.0022$);HE染色坏死区多于对照组。结论 rhES可减少肿瘤血管生成,增加肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长。

关键词:胃肿瘤;肿瘤细胞,培养的;内皮抑素;疾病模型,动物

中图分类号:R735.2; Q592.1

文献标识码:A

The influences of recombinant human endostatin on the growth of gastric cancer in nude mice

WANG Tian-bao¹, WU Xiao-peng², ZHANG Wei-dong³, LI Zhao-ting²

(1. Department of Gastrointestinopancreatic Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of General Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China; 3. Department of Pathology, Academy of Medical Sciences of Shandong Province, Jinan 250012, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of recombinant human endostatin (rhES) on the growth of transplanted gastric cancer in nude mice. **Methods** At the 20 day after tumor transplantation, twelve Balb/c-nu/nu mice were randomly divided into two groups: (1) Control group: 0.9% NS 0.1ml was injected around the tumor, once a day for 10 days; (2) experimental group: rhES 2mg/kg was injected around the tumor once a day for 10 days. The tumors bulk were measured every five days until five days after injection. VEGF, bFGF, PDGF, VEGF-c, VEGFR-3, FVIII Ag, PCNA, bcl-2 and apoptosis index were examined. The tumor inhibition rate (TIR) and tumor condensing rate (TCR) were calculated. The difference of AI, tumor bulk and MVD between the 2 groups were assessed. **Results** The difference of the tumor bulk between the two group was no statistical significance before injection, but at the time of 15 days after beginning of the injection, the difference was significant ($P=0.0001$); and in the experimental group the tumor bulk was also decreased significantly after treatment ($P=0.0015$). MVD, VEGF, bFGF, PDGF, VEGF-c, VEGFR-3 and bcl-2 expressed lower in experimental group than those in control group; PCNA expression was the same in the 2 groups. AI increased significant in experimental group compared with in control group ($P=0.0000$). In experimental group, the TIR was 91.2%, TCR 53.5%, and HE staining presented more necrotic areas. **Conclusions** rhES can inhibit angiogenesis of the tumor and promote tumor cell apoptosis, so that can inhibit the growth of tumor.

Key words: STOMACH NEOPLASMS; TUMOR CELLS, CULTURED; ENDOSTATIN; DISEASE MODELS, ANIMAL

CLC number: R735.2; Q592.1

Document code: A

收稿日期:2003-04-22; 修订日期:2003-07-19。

作者简介:王天宝(1969-),男,山东夏津人,中山大学附属第一医院主治医师,博士,主要从事胃肠肿瘤方面的研究。

目前认为新生血管对实体肿瘤患者的病期进展有重要作用,抑制肿瘤血管形成可抑制肿瘤生长。1997年,O'Reilly等^[1]发现鼠源内皮抑素(ES),能特异性地抑制血管内皮细胞增殖,有效地抑制血管生成及肿瘤生长。笔者用本室已建立的胃癌荷瘤裸鼠作为实验动物模型,给予重组人内皮抑素(rhES)治疗,以研究rhES对人胃癌裸鼠瘤株生长的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 动物

12只Balb/c-nu/nu裸鼠购自中国医学科学院动物研究所,周龄5~10周,体重10~20g,雌、雄兼用。

1.2 肿瘤移植方法

将第7代瘤株癌组织切成1mm×1mm×1mm组织块,0.3%威力碘消毒裸鼠右后肢背侧皮肤,眼科剪刀剪开皮肤约0.3cm,并建立长约0.6cm的皮下隧道,用12号针头将3块1mm×1mm×1mm胃癌组织送入其中,再次消毒皮肤,自瘤株肿瘤离体到皮下移植完毕约30~40min。

1.3 实验分组

移植20d后,将裸鼠随机分为2组(每组6只):(1)实验组,rhES(山东烟台荣昌制药有限公司惠赠)2mg/kg,瘤周注射,1次/d,连用10d;(2)对照组瘤周给予生理盐水注射0.1ml,1次/d,连用10d。实验操作均遵循无菌原则。

1.4 观察项目

1.4.1 移植瘤生长情况 移植后逐日观察荷瘤鼠生活情况,肿瘤大小与外观,记录潜伏期。用药后,每5d测量肿瘤长径(a),短径(b),按 $V = a \times b^2 / 2$ 求得肿瘤的近似体积。计算抑瘤率(tumor inhibition rate, TIR), $TIR = (\text{对照组肿瘤体积} - \text{实验组肿瘤体积}) / \text{对照组肿瘤体积} \times 100\%$ 。肿瘤缩小率(tumor condensing rate, TCR), $TCR = (\text{治疗前肿瘤体积} - \text{治疗后肿瘤体积}) / \text{治疗前肿瘤体积} \times 100\%$ 。绘制移植瘤生长曲线。

1.4.2 HE染色病理检查 处死时移植瘤株瘤组织行常规病理检查;肝、肺行HE染色病理检查确定有无转移。

1.4.3 SABC免疫组织化学检测 免疫组化检测移植瘤组织中VEGF, bFGF, VEGF-c, PCNA, FVIIIaG以及bcl-2表达情况,操作步骤依说明书进行。VEGF, bFGF, VEGF-c, PCNA以及bcl-2判断标准:阳性表达为细胞胞浆着色(PCNA胞核染色)呈棕黄色,阴性为未见棕黄色染色的细胞;低表达(+)为每200倍视野阳性细胞数<20%;高表达(++)为每200倍视野阳性细胞数>20%。基于FVIIIaG染色的微血管计数:选择微血管密集的4个区域,在200倍显微镜下计数血管数,取平均值作为每个标本的微血管数。

1.4.4 原位杂交测定PDGD表达 操作步骤依说明书进行,结果判断同SABC判断指标。

1.4.5 原位末端标记法测定肿瘤细胞凋亡 操作步骤依说明书进行。评价方法:在400倍视野下计数4个凋亡细胞集中区,平均每100个肿瘤细胞中凋亡细胞数,即凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.5 统计学处理

用SAS6.12统计软件分析实验组与对照组AI, MVD及肿瘤体积差异的显著意义。

2 结果

2.1 移植瘤生长情况

瘤株肿瘤生长潜伏期均为8~10d,肿瘤呈膨胀性生长,质地略韧,活动。移植后20d,对照组裸鼠瘤株肿瘤体积平均 $(202.7 \pm 49.2) \text{ mm}^3$,实验组为 $(205.2 \pm 55.5) \text{ mm}^3$ ($t = -0.2992$, $P = 0.7716$)。用药后对照组依然迅速生长,而实验组肿瘤生长立即被阻止而且迅速缩小。用药开始后15d,对照组肿瘤体积平均为 $(1057.4 \pm 114.2) \text{ mm}^3$,实验组平均为 $(95.4 \pm 28.1) \text{ mm}^3$ ($t = -20.0442$, $P = 0.0001$)。抑瘤率为91.2%,平均TCR为53.5%。实验组用药后肿瘤体积明显小于用药前($t = 4.3194$, $P = 0.0015$)。肿瘤生长曲线随时间延长而迅速下降,与对照组迅速上升形成鲜明对比(图1)。对照组部分裸鼠出现恶液质,局部皮肤破溃,但均未见肝、肺转移,而实验组所有裸鼠生活良好,均未出现恶液质,亦未见肝、肺转移。

rhES 注射后肿瘤体积迅速下降,与对照组迅速上升形成鲜明对比

图1 rhES 实验组与对照组移植瘤生长曲线比较

2.2 HE 染色病理检查

两组瘤株均为中分化腺癌:癌细胞核深染、增大,可见双核,胞浆丰富,细胞排列欠规则,有腺腔结构,与人胃癌病理结构相同,但实验组坏死区多于对照组。肝、肺均未见转移。

2.3 SABC 免疫组化检测

对照组 VEGF, bFGF, VEGF-c, VEGFR-3, bcl-2 及 PCNA 表达强度均为(++);基于 F VIII Ag 染色而测定的 MVD 平均为(20.0 ± 4.56)个/ $200 \times \text{Hp}$ 。实验组 SABC 免疫组织化学检测 VEGF, bFGF, VEGF-c, VEGFR-3 及 bcl-2 表达强度为(0~+);MVD 平均为(10.0 ± 1.52)个/ $200 \times \text{Hp}$ (图2),均明显低于对照组($t = 5.0965, P = 0.0022$)。但 PCNA 表达强度为(++).

A:实验组 MVD (10.0 ± 1.52) 个/ $200 \times \text{Hp}$; B:对照组 MVD (20.0 ± 4.56) 个/ $200 \times \text{Hp}$

图2 rhES 实验组与对照组移植瘤组织 MVD 比较 ($\times 200$)

2.4 原位杂交

实验组 PDGF 表达强度为(0~+);对照组 PDGF 表达强度为(++).

2.5 肿瘤细胞 AI

对照组 AI 平均为(2.42 ± 0.58)%;实验组 AI 平均为(5.77 ± 0.83)% ($t = 8.0724, P = 0.0000$) (图3)。

A:实验组肿瘤细胞凋亡多; B:对照组凋亡细胞较少

图3 rhES 实验组与对照组移植瘤细胞凋亡比较 ($\times 400$)

3 讨论

治疗肿瘤应把肿瘤分为两个不同的细胞群:肿瘤细胞群与血管内皮细胞群。O'Reilly^[1]报道内皮抑素治疗肿瘤并不是使肿瘤细胞的增殖减少,而是肿瘤细胞凋亡速度比治疗前高出7倍。内皮细胞具有正常的染色体基因组,存在遗传上的稳定性,不易产生耐药性,因此针对内皮细胞治疗实体肿瘤广谱有效。Boehm 等^[2]用 ES 治疗小鼠的实验性 Lewis 肺癌,未出现耐药性。组织切片发现,残留肿瘤组织只有少量或完全没有血管生成,说明 ES 能抑制内皮细胞生长和血管生成。骆成玉等^[3]报道 ES 及 ES 与 5-FU 联合应用可使结肠癌肝转移率明显降低。Yamanaka 等^[4]将含有 ES 基因的病毒注入鼠 B16 脑瘤瘤体内,可明显抑制肿瘤生长,减少瘤组织血管形成。刘江秋^[5]发现 rhES 抑制小鼠黑素瘤的生长、转移及新生毛细血管的形成。

本实验结果显示, rhES 明显抑制胃癌荷瘤裸鼠肿瘤的生长, TIR 高达 91.2%, 平均 TCR 为 53.5%, 效果极其明显。且 MVD 明显减少, 说明 rhES 可使实体肿瘤的血管生成减少, 从而使肿瘤缺氧, 营养供应不足, 促进凋亡, 进一步抑制肿瘤生长。PCNA 表达均为强阳性, 提示 rhES 并不影响肿瘤细胞的增殖; 凋亡抑制基因 bcl-2 表达下调, AI 升高, 证实 rhES 可促进胃癌荷瘤裸鼠肿瘤细胞发生凋亡。Bertolini 等^[6]发现 ES 作用机制在于抑制内皮细胞增

殖,加速其凋亡。实验组裸鼠均未见消瘦、出血、食欲不振等毒副作用,对 rhES 耐受良好,与文献^[1]报道相一致。但本实验还发现 rhES 能下调与血管生成有关的因子如 VEGF, bFGF, PDGF 表达及与淋巴管生成有关的因子如 VEGF-c, VEGFR-3 表达,其确切机制未明。然而上述因子表达下调,肯定能减少微血管及淋巴管生成,从而抑制肿瘤生长及转移。李文等^[7]经生物学活性测定 rhES,发现可抑制 bFGF 对牛毛细血管内皮细胞的增殖作用。孙惠川等^[8]给肝癌复发转移模型皮下注射 rhES 4 mg/(kg·d),结果显示 rhES 不仅抑制肝癌复发,而且减少肺转移灶的数目,延长裸鼠生存期。rhES 可减少原位移植肝癌的 MVD,增加肿瘤细胞凋亡^[9];抑制人舌癌的浸润与血行转移^[10]。同时给予自杀基因与内皮抑素基因治疗人肾癌裸鼠肿瘤疗效显著^[11]。

综合本文资料及文献,笔者认为 rhES 对胃癌的影响包括:(1) rhES 抑制微血管内皮细胞的迁移、增殖,抑制肿瘤血管生成;(2) rhES 不影响肿瘤细胞增殖,但增加肿瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤的生长;(3) rhES 抑制肿瘤生长具有广谱性,尚未发现耐药性及毒副作用。

参考文献:

[1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and human tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.

[2] Boehm T, Folkman J, Browder T, *et al.* Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [J]. *Nature*, 1997, 390(6658): 404-407.

[3] 骆成玉,赵丹宁,李世拥,等. 内皮抑素对结肠癌肝转移

的干预作用[J]. *中华外科杂志*, 2001, 39(3): 188-190.

- [4] Yamanaka B, Zullo SA, Ramsey J, *et al.* Induction of therapeutic antitumor antiangiogenesis by intratumoral injection of genetically engineered endostatin-producing Semliki Forest virus [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(10): 796-802.
- [5] 刘江秋,李忠义,陈林生,等. 重组人血管内皮抑制素抗肿瘤效应的应用研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, 17(1): 63-64.
- [6] Bertolini F, Fusetti L, Mancuso P, *et al.* Endostatin, an antiangiogenic drug, induces tumor stabilization after chemotherapy or anti-CD20 therapy in a NOD/SCID mouse model of human high-grade non-Hodgkin lymphoma [J]. *Blood*, 2000, 96(1): 282-287.
- [7] 李文,朱美财,王荫静,等. 人内皮抑素克隆表达及对血管内皮细胞生长的抑制作用[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20(5): 402-404.
- [8] 孙惠川,汤钊猷,王鲁,等. Endostatin 抑制裸鼠移植性肝癌切除后的复发转移[J]. *中华肿瘤杂志*, 2000, 22(6): 469.
- [9] Tai KF, Chen PJ, Chen DS, *et al.* Concurrent delivery of GM-CSF and endostatin genes by a single adenoviral vector provides a synergistic effect on the treatment of orthotopic liver tumors [J]. *J Gene Med*, 2003, 5(5): 386-98.
- [10] Nyberg P, Heikkila P, Sorsa T, *et al.* Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase-2, -9, and -13 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(25): 22404-22411.
- [11] Pulkkanen KJ, Laukkanen JM, Fuxe J, *et al.* The combination of HSV-tk and endostatin gene therapy eradicates orthotopic human renal cell carcinomas in nude mice [J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(11): 908-916.