

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0276-04

血管抑素抑制人脑胶质瘤生长及病理学研究

苏 心, 张文治 (天津市环湖医院病理科, 天津 300060)

[摘 要] **目的:** 观察人血管抑素(Angiostatin, AS)对小鼠脑胶质瘤皮下移植瘤生长的抑制作用。**方法:** 用 MTT 法观察 AS 对血管内皮细胞系 ECV-304 和人脑胶质瘤细胞系 TJ-905 增殖的影响; 建立荷 G422 脑胶质瘤小鼠皮下移植模型, 皮下注射 AS, 计算瘤体比和抑瘤率。**结果:** (1) AS 对 ECV-304 的抑制作用随着剂量的增加而增强, AS 对 TJ-905 无影响; (2) 动物实验显示, AS 剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 时抑瘤率分别为 21.8% 和 84.3% ; (3) 免疫组化 VIII 因子染色表明实验组与对照组之间在血管发育及数量方面均有差别。**结论:** AS 在体外对胶质瘤细胞无抑制作用, 在体内能通过抑制血管内皮细胞增殖而抑制胶质瘤的生长。

[关键词] 血管抑素; 血管内皮细胞系; G422 脑胶质瘤

[中图分类号] R73-36⁺² [文献标识码] A

Inhibitory Effects of Angiostatin on the Growth of Human Glioma and It's Pathological Study

SU Xin, ZHANG Wen-zhi (Department of Pathology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin, 300060 China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of human angiostatin (AS) on the subcutaneously transplanted mouse glioma. **Methods:** Effects of AS on the proliferation of angioendothelial cell line ECV-304 and human glioma cell line TJ-905 were observed with MTT method. Mouse model of subcutaneously transplanted of glioma line G422 was established. AS was injected subcutaneously, tumor ratio and tumor inhibitory rate were estimated. **Results:** (1) Inhibitory effects of AS on ECV-304 enhanced with the increase of dose, while AS exerted no effect on TJ-905 ; (2) It was shown with animal experiments that tumor inhibitory rates were 21.8% and 84.3% with AS doses of 10 mg and $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively; (3) Immunochemical factor VIII staining indicated there the differences between the control and the test groups in both the angiodevelopment and quantity. **Conclusion:** There was no inhibitory effect for AS to angioma cell *in vitro*, however *in vivo*, it inhibited the glioma growth via its inhibitory effect on the proliferation of angioendothelial cell line. It was then suggested that AS would be of wide application in tumor treatment.

[**Key words**] angiostatin; angioendothelial; cell line; G422 glioma

* AS 是 1994 年从荷瘤小鼠血液和尿液中分离纯化得到的一种内源性血管生成抑制因子^[1]。它直接作用于血管内皮细胞, 从而抑制肿瘤血管生成, 使肿瘤细胞因缺血、缺氧而部分死亡, 达到抑制肿瘤生长和转移的目的^[2]。脑胶质瘤是一种恶性度极高的肿瘤, AS 针对胶质瘤的作用国内鲜有报道。本文研究 AS 对小鼠 G422 脑胶质瘤皮下移植瘤生长的抑制作用, 并初步探讨其作用机理。

人血浆纤溶酶原购自中国医学科学院血研所科技公司; DMEM 培养液、人重组纤维母细胞生长因子 (FGF-2)、胎牛血清 (FBS) 购自 GIBCO 公司; 弹性蛋白酶、抑肽酶购自 SIGMA 公司; Sepharose-4B-Lysine, Heparin Sepharose CL-6B 购自 Pharmacia 公司; 人脑胶质瘤细胞系 TJ-905 购自天津医科大学附属总医院; 人血管内皮细胞系 ECV-304 由天津市第一中心医院提供; 荷 G422 脑胶质瘤细胞系 BALB/c 小鼠购自北京天坛医

1 材料与方 法

1.1 主要材料

* [基金项目] 天津市卫生局课题(编号: 99KY027)

[作者简介] 苏心(1957-), 女, 天津人, 副主任技师, 主要从事细胞生物学研究。

院神经外科研究所;血管Ⅷ因子单抗购自中山公司。

1.2 方法

1.2.1 AS 的制备

参照夏国宏^[3]方法,用弹性蛋白酶水解人纤溶酶原,经过 Sepharose 4B-Lysine 及 Heparin Sepharose CL-6B 色谱柱的分离纯化,得到分子量为 38,000 的蛋白,即为 AS。

1.2.2 AS 对 ECV-304 细胞系的作用

取对数生长期的 ECV-304 细胞,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液调细胞浓度为 $8 \times 10^7/L$,接种于 24 孔板,每孔 0.5 ml,于 37℃,5% CO₂,95% 空气中培养 24 h,换入含 1 μg/L FGF-2 的无血清培养液,同时加入不同浓度(1~30) mg/L 的 AS,继续培养 72 h 后。将各孔细胞消化脱壁,计数,各浓度作 4 复孔。以 TJ-905 细胞系作实验对照。

1.3 动物实验

将荷 G422 脑胶质瘤细胞系的 BALB/c 小鼠 1 只处死,剥离出肿瘤,充分剪碎,匀浆,接种到津白-2 号小鼠右腋皮下。接种 10 d 后,肿瘤长到(8~10) mm²,将小鼠分组进行皮下给药。具体分组如下:对照组 10 只,每天注射生理盐水 0.1 ml;低剂量组 10 只,每只按 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹注射 0.1 ml;高剂量组 10 只,每只按 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹注射 0.1 ml。连续给药 14 d,于第 15 天脱椎处死,称体重、瘤重,计算瘤体比及抑瘤率。

1.4 病理学检查

HE 染色观察 AS 对肿瘤组织学变化的影响,免疫组织化学Ⅷ因子染色观察 AS 对肿瘤组织中血管作用的影响(实验由天津医科大学病理解剖教研室完成)。

1.5 统计学方法

应用 SPSS8.0 软件进行 *t* 检验。

2 结果

AS 对 ECV-304 生长抑制作用曲线(见图 1)。

图 1 血管抑素对 ECV-304 和 TJ-905 细胞系的作用

Fig. 1 Effects of angiostatin on cell lines ECV-304 and TJ-905

由图 1 可见,AS 对血管内皮细胞有明显的抑制作用,尤其是当浓度为 30 mg/L 时,细胞几乎全部死亡,而对脑胶质瘤细胞几乎无任何抑制作用。

血管内皮细胞是新生血管形成的关键细胞,单层生长,呈多角形镶嵌排列,似铺路石状。加入 AS 72 h 后,光镜下可见在 15 mg/L AS 的孔内,内皮细胞胞浆出现大量空泡,胞膜呈断裂状,细胞间隙加大,细胞明显减少,高倍镜下,可见细胞器的变化,以线粒体断裂为主(见图 2)。

图 2 AS 对血管内皮细胞系 ECV-304 作用形态学比较(×200)

Fig. 2 Morphological comparison of effects of AS on angioendothelial cell line ECV-304(×200)

A: Cell morphology of ECV-304;

B: Cell morphology of ECV-304 treated with 15 mg/L

2.2 AS 对 G422 小鼠可移植胶质瘤体内生长的抑制作用

解剖肿瘤所见,对照组瘤体完整,体积较大,组织较硬,呈灰白色,广泛浸润;低剂量组瘤体不完整,大量液化,呈粉红色,瘤体界限不清,坏死严重;高剂量组瘤体完整且较硬,呈灰白色,体积明显缩小,无出血和液化及坏死,界限较清楚,未见组织黏连,浸润不明显。

各组间抑瘤率比较:动物实验结果(见表 1)。数据显示,对照组与低剂量组间瘤体比比较有显著差异($t=2.541, P=0.021$),抑瘤率为 21.8%。高剂量组与对照组间比较有极显著性差异($t=12.045, P=0$),

抑癌率为 84.3%。由此可见,皮下注身 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,则治疗效果非常显著。
 d^{-1} 可抑制 G422 胶质瘤生长,而皮下注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

表 1 AS 对 G422 可移植小鼠脑胶质瘤生长抑制作用

Tab. 1 Inhibition effects of angiostatin on the growth of murine G422 glioma ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Tumor wt (g)	Ratio of tumor vs body	Tumor inhibited ratio(%)	t
Control	10	9.42 ± 2.08	0.26 ± 0.05	0	0
Low-dose	9	7.37 ± 1.998	0.21 ± 0.05	2.174 [△]	21.8
High-dose	10	1.48 ± 0.445	0.05 ± 0.01	13.041 ^{△△}	84.3

Note: 1 mouse of low-dose group died in experiment; (Δ : $0.05 > P > 0.01$); ($\Delta\Delta$: $P < 0.01$)

2.3 AS 抑制 G422 脑胶质瘤生长的病理形态学观察结果

(1) HE 染色:对照组肿瘤细胞生长良好。细胞呈圆形,胞浆量中等、嗜碱性。细胞核呈圆形,染色质粗,深染,偶见小核仁,部分细胞核偏位。核分裂易见,可见病理性核分裂象,并可见多核瘤细胞。肿瘤细胞呈弥漫性或巢状分布,排列紧密,间质成分稀少,肿瘤细胞之间见薄壁毛细血管。肿瘤中央见灶性凝固性坏死,周边部呈浸润性生长方式浸润于横纹肌之间,无包膜。低剂量组显示肿瘤细胞形态与分布同对照组,肿瘤细胞间血管数量较对照组减少。肿瘤内见不规则片块状凝固性坏死,其面积和范围大于对照组。高剂量组肿瘤形态同对照组,肿瘤中央大片凝固性坏死,部分肿瘤仅于周边见少许肿瘤细胞存活,其坏死面积明显大于对照组,并大于低剂量组。肿瘤细胞间偶见毛细血管(图片略)。(2) 免疫组织化学 VIII 因子染色:免疫组织化学 VIII 因子染色阳性细胞为血管内皮细胞,阳性物质为棕黄色,位于胞浆内。对照组染色结果示肿瘤细胞间见较多量薄壁毛细血管,呈丛状分布,管腔清晰可辨(图 3)。

低剂量组示肿瘤间血管较对照组数量减少,部分血管发育不充分,仅为实性血管内皮细胞条索,管腔结构不清(图 3B)。高剂量组仅见少许阳性内皮细胞团,其数量明显少于对照组及低剂量组,管腔结构亦不清楚(图 3C)。

3 讨论

肿瘤的生长和转移均呈严格的血管形成依赖性,即需要血管新生以输送营养及生长因子。肿瘤血管内皮细胞分裂次数比正常内皮细胞多 50 倍,使肿瘤组织极易形成新的血管,维持肿瘤生长。同时,新生血管又提供了肿瘤细胞的转移通道,是促进肿瘤转移的重要途径之一。

图 3 免疫组化 VIII 因子染色($\times 200$)

Fig. 3 Immunohistochemical factor VIII staining($\times 200$)

A: Control; B: Low-dose group; C: High-dose group

O'Reilly 等^[4]于 1994 年从 Lewis 肺癌小鼠的血清和尿液中分离出分子量为 38 kD 的蛋白,即为血管抑素。氨基酸序列分析提示 AS 与人纤溶酶原内部的一个片段有 98% 的同源性。AS 抑制血管内皮细胞增殖的功能是由纤溶酶原的 5 个 Kringle 区(即含有 3 对二硫键的区域)的前 3 个完成的。研究表明,AS 能特异性地抑制内皮细胞的增殖,而对其它类型的细胞如肿瘤细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞等的增殖无影响^[1]。因此,利用血管生成抑制剂特异性地抑制血管内皮细胞的增殖,理论上可抑制肿瘤的生长和转移而不影响其它宿主细胞。

本研究在对比了 AS 对 ECV-304 和 TJ-905 细胞系的不同作用的基础上,还观察了在血管形成初期和血管形成期 AS 对增殖的血管内皮细胞的抑制作用是否相同及 AS 对 ECV-304 细胞周期的影响,结果证明,在同一浓度下,AS 在上述两种情况下对 ECV-304 的抑制率无显著差异,经流式细胞仪检测,AS 对 ECV-304 细胞的抑制作用是通过阻止细胞从 G₀/G₁ 期进入 S 期来实现的(实验数据略)。

在抗血管生成和抗脑胶质瘤的体外细胞学研究的基础上,本研究进一步通过荷 G422 脑胶质瘤 BALB/c 小鼠模型观察了 AS 对实体瘤的抑制作用。在皮下给药,剂量为 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 和 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 情况下,治疗 14 d,2 个剂量组与对照组相比均有差异。结

果表明,AS 能显著抑制体内肿瘤的生长,而在体外实验中,AS 对体外生长的肿瘤(无血管供应)无抑制作用,表明 AS 主要通过破坏肿瘤血管来抑制肿瘤的生长。在整个治疗过程中,小鼠活动良好,未见厌食、腹泻等副作用。由于恶性胶质瘤是人体富含血管的肿瘤之一,其血管内皮细胞显著增生的程度随胶质瘤恶性程度增高而愈加明显,所以应用血管抑素治疗肿瘤具有其它方法无法比拟的优越性,不产生耐药性,无毒副作用,给药途径简便。随着 AS 研究的不断深入开展,相信 AS 在治疗肿瘤方法将会有更广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, *et al.* Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lawis lung carcinoma[J]. *Cell*, 1994, 79: 315-328.
- [2] Wu ZH, O'Reilly MS, Folkman J, *et al.* Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Res Commu*, 1997, 236: 651-654.
- [3] 夏国宏, 卢卫新, 殷国勇, 等. Angiostatin 的分离纯化及对 B16 黑色素瘤的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(4): 280-283.
- [4] Stathakis P, Lay AJ, Fitzgerald M, *et al.* Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle 5 of plasmin[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(13): 8910-8916.

[收稿日期] 2002-06-24

[修回日期] 2002-08-10

II 型腺相关病毒对人类单核细胞来源的树突状细胞转染的研究

DC 是诱导初始型 T 细胞免疫作用的有效抗原提呈细胞。在现代免疫疗法中,用病毒或非病毒为载体冲击 DC,这种 DC 的基因修饰可表达抗原和免疫调节分子,临床用法可诱导特异性免疫应答,以治疗恶性肿瘤感染,免疫抑制等疾病。RAAV 具有以下特点:(1) rAAV 可转染分裂的未分裂的细胞,即可在激活阶段,也可在成熟阶段进行 DC 的转染;(2) rAAV 缺乏病毒编码序列,即 rAAV 转染的 DC 不能合成任何病毒蛋白;(3) rAAV 还具有维持转基因表达的能力,转基因表达可维持转染细胞的存活力,因此,实验中应用 rAAV 为载体转染 MO 刺激的 DC,以检测 rAAV 为载体的 DC 基因修饰是否有利于 DC 疫苗治疗。

在该实验中,人类 MO 诱导的 DC 在 IL-4 GM-CSF 中培养 6 d,第 7 天用 wtAAV 和 Ad2 将其感染,低水平的转染和 Ad 蛋白的表达即可检测 AAV 的复制。用 rAAV-luc 或 rAAV-GFP 感染在 IL-4 和 GM-CSF 中培养 6 d 的 MO 来源的 DC,并在细胞因子中培养 48 h,用荧光流式细胞计量术分析 GFP 报告基因的表达,可测定转染 DC 的百分率。当 MOI 小于 100 时 DC 的转染会有很大程度,减弱拓攪异构酶抑制剂鬼臼乙叉苷可增强 DC 转基因的表达。该实验中,将 MO 诱导的 DC 经 IL-4 GM-CSF 培养 6 个月后,用 0.5 ~ 50 μm 的鬼臼乙叉苷处理 16 h,根据台盼蓝染料排除试验,当剂量至 50 μm 时才引起明显的细胞病变,在经鬼臼乙叉苷处理后,再用 MOI 为 100 的 rAAV-luc 进行模拟转染和转染,虫荧光酶测定表明:虫荧光素酶活性依赖鬼臼乙叉苷剂量增长,当剂量达至 50 μm,虫荧光素酶活性最大。经流式细胞计量测定与分析可得:(1) 鬼臼乙叉苷处理及 rAAV-luc 感染并不影响 DC 活性;(2) 不同亚群 DC 均表达相同量的虫荧光素酶,有特异 DC 表型的细胞可进行有效的 rAAV 转基因表达。实验中,在用 rAAV-luc 转染 MO 后,进行虫荧光素酶测定前,将 DCs 在无细胞因子或仅有 GM-CSF 或有 IL-4 冲击的 GM-CSF 3 种环境中培养,结果表明,IL-4 冲击的 GM-CSF 中培养的转染 DC 具有最高的虫荧光素酶活性水平。作者还应用了不同供者的反应性外周淋巴细胞,检测单向 MLR,结果表明,不论用 AAV 感染还是转染均不影响 DC 的免疫刺激活性。实验中还应用特异性抗 CD40 和 CD1a 的抗体,(DC 亚群助性表达 CD40、CD1a)通过双色荧光激活细胞分类及流式细胞计量术,分析实验后的 DC,检测近 100 分裂间期细胞核,结果有 21% 能检测到 rAAV 基因组,表明能有效转染。

该研究表明,rAAV 作为一种载体,在 DC 为基础免疫治疗的研究和应用中具有一定的应用前景。

(奚桂林 摘自 *Journal of Virology*, 2001, 75(9): 9493-9501,于益芝 校)