

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )04-0274-03

## 重组人血管内皮抑制素对小鼠 Lewis 肺癌肿瘤抑制作用

李忠义<sup>1</sup>, 刘江秋<sup>1</sup>, 徐璐<sup>2</sup>, 刘万兴<sup>3</sup>, 夏结来<sup>4</sup>, 汪军远<sup>2</sup>( 1. 沈阳军区军事医学研究所, 沈阳 110034; 2. 辽宁肿瘤生物基因治疗中心, 沈阳 110044; 3. 鞍山曙光医院, 沈阳 114033; 4. 第四军医大学统计学教研室, 西安 710032 )

[ 摘要 ] **目的:** 研究重组人血管内皮抑制素(rhu-Endostatin)对小鼠 Lewis 肺癌肿瘤生长的抑制作用,寻找其量效关系及其作用机制。**方法:** 每只小鼠剃毛背部皮下接种 Lewis 肺癌细胞,待肿瘤长至 100 mm<sup>3</sup>左右时,随机分为低、中、高 3 个剂量组,每次分别注射 rhu-Endostatin 5 mg/( kg · d ), 15 mg/( kg · d )或 30 mg/( kg · d ),每天 1 次,连续 21 d。同时设置生理盐水对照组和注射用环磷酰胺[ 100 mg/( kg · d )]治疗对照组。于第 22 天断颈处死小鼠,称皮下肿瘤的重量,并取脑、肺、肝、脾和肾切片做病理学检查。**结果:** 血管内皮抑制素治疗组的曲线下面积明显小于肿瘤对照组( *P* < 0.01 )。病理切片检查显示,治疗组肿瘤有大面积的坏死,瘤周毛细血管消失。**结论:** rhu-Endostatin 可明显抑制小鼠 Lewis 肺癌肿瘤的生长(高剂量组可达 58.8% ),转移和新生毛细血管的形成。

[ 关键词 ] Lewis 肺癌; 血管内皮抑制素; 肿瘤转移

[ 中图分类号 ] R734.2 [ 文献标识码 ] A

## Anti-Tumor Effect of Recombinant Human Endostatin on the Growth of Mouse Lewis Lung Carcinoma

LI Zhong-yi<sup>1</sup>, LIU Jiang-qiu<sup>1</sup>, XU Lu<sup>2</sup>, LIU Wan-xing<sup>3</sup>, XIA Jie-lai<sup>4</sup>, Wang Jun-yuan<sup>2</sup>( 1. Military Medical Institute of Shenyang Military Region, Shenyang 110034, China; 2. Liaoning Tumor Biological Gene-Therapy Center, Shengyang 11044, China; 3. Anshan Shuguang Hospital; Shengyang 114033, China; 4. Department of Statistics, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the anti-tumor effect of recombinant human Endostatin ( rhu-Endostatin ) on the growth of mouse Lewis lung carcinoma cells, and to elucidate the dose-effect relationship and its possible mechanism. **Methods:** Lewis lung carcinoma cells were inoculated to mice ( 10<sup>6</sup>/ml ). When tumor size reached about 100 mm<sup>3</sup>, the mice were randomly divided into low, medium and high dose groups with saline and CSA [ 100 mg/( kg · d ) ] as control. Rhu-Endostatin [ 5, 15, 30 mg/( kg · d ) ] was injected to mouse once a day for 21 days. At the 22 nd day, mice were executed, the tumor weights was calculated, and sections of brain, lung, liver, spleen and kidney was subjected to physiological analysis. **Results:** Area under curve in the endostatin-treated group was obviously less than that in tumor control group ( *P* < 0.01 ). Pathological study revealed that large areal necrosis arose in tumor and newborn capillaries around the tumor disappeared. **Conclusion:** The results revealed that rhu-Endostatin inhibited the growth, metastasis and angiogenesis of mouse Lewis lung carcinoma with the highest inhibition rate of 58.8% .

[ Key words ] Lewis lung carcinoma; Endostatin; metastasis

\* 1971 年, Folkman 博士等<sup>[1-2]</sup>就曾指出, 实体瘤及其转移灶生长至 1 ~ 2 mm 以上时, 要进一步生长和转移就需要新生毛细血管提供氧和营养, 因而抑制肿瘤毛细血管的生成可以作为治疗癌瘤的一种手段<sup>[3]</sup>。近些年来, 被称为“肿瘤饥饿疗法”的抗肿瘤血管生成剂

及其抗肿瘤作用机理的研究日益引起国内外学者的广

[ 基金项目 ] 辽宁省科学技术厅( 2001226001 )基金资助

[ 作者简介 ] 李忠义( 1946- ), 男, 河北抚宁人, 研究员, 博士生导师, 主要从事抗肿瘤基因药物及病毒疫苗的研究

泛关注<sup>[4]</sup>。Orilly 等<sup>[5]</sup>1997 年发现了一种相对分子量为 20 kD 新蛋白质,将其命名为血管内皮抑制素(Endostatin)。我国李忠义等<sup>[6,7]</sup>也发现人的 Endostatin,并从人肝脏 cDNA 文库中筛选克隆到该基因,在国内率先在酵母菌中表达出可溶性重组人 Endostatin(rhu-Endostatin)。本研究对我们研制的 rhu-Endostatin 抑制小鼠 Lewis 肺癌的生长和转移的作用进行实验研究,并初步探讨了其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、细胞株等

C<sub>57</sub>BL/6 小鼠(雄性),5 周龄,体重 18~22g,由中国医学科学院药物研究所实验动物室提供(医动字 9-3004 号)。Lewis 肺癌细胞株,由上海第二军医大学免疫学教研室提供。注射用 rhu-Endostatin,由辽宁卫星生物制品研究所生产(45 mg/支),批号 000201。对照药物注射用环磷酰胺,江苏恒瑞医药股份有限公司生产(0.2 g/支),生产批号 000403。

### 1.2 rhu-Endostatin 的抑瘤实验

将 Lewis 肺癌细胞( $10^6$ /ml)接种于每只 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠右腋下,待肿瘤长到 100 mm<sup>3</sup>时,断颈处死小鼠,无菌操作摘出皮下肿瘤,用生理盐水制成肿瘤细胞悬液( $5 \times 10^6$ /ml)。取 0.2 ml 肿瘤细胞悬液( $10^6$ )种植于每只小鼠的背部皮下。随机将 50 只小鼠分成 5 组,每组 10 只,为 rhu-Endostatin 低、中、高剂量治疗组、生理盐水(肿瘤对照)组和环磷酰胺治疗组。种植后待肿瘤长至 100 mm<sup>3</sup>左右时,用 rhu-Endostatin 进行治疗,其低、中、高 3 个剂量分别为 5 mg/(kg·d),15 mg/(kg·d),30 mg/(kg·d),共 21 次。注射途径为腹腔注射,给药体积为 0.5 ml。肿瘤对照组注射等量生理盐水(相应溶剂)。环磷酰胺治疗组注射 100 mg/(kg·d)的环磷酰胺(单次冲击量治疗)。

### 1.3 rhu-Endostatin 抑瘤效果观察

给药期间观察小鼠的一般情况,隔天称量小鼠体重(g),计量其饮食、饮水量,肿瘤体积采用精密卡尺对荷瘤小鼠的肿瘤长径和短径进行测量。肿瘤体积(V)按下列公式计算: $V = b^2 \times a \times 0.52$ ,其中 a 为长径,b 为短径。于 22 d 将荷瘤小鼠断颈处死,解剖取皮下肿瘤称重。同时取小鼠肿瘤、脑、肺、肝、脾和肾,用 50 ml 福尔马林固定、切片、做病理学检查。

## 2 结果

### 2.1 体内抑瘤实验

经 Endostatin 治疗的荷瘤小鼠与肿瘤对照组相比较,肿瘤体积明显缩小。采用重复测量数据统计分析方法,Endostatin 治疗组低、中、高 3 个剂量组的曲线下面积( $\bar{x} \pm s$ )均明显小于肿瘤对照组的曲线下面积,经秩和检验 P 值均 <0.01,结果表明 Endostatin 治疗组有明显的抑瘤效果(图 1)。而 Endostatin 治疗组低、中、高 3 个剂量组和环磷酰胺治疗组的抑瘤效果则均无明显差别(P 值均 >0.05)。

图 1 rhu-Endostatin 抑制小鼠 Lewis 肺癌肿瘤生长的动态变化  
Fig. 1 Dynamic change of inhibiting mouse Lewis lung carcinoma growth by rhu-Endostatin

### 2.2 Endostatin 抑制小鼠 Lewis 肺癌肿瘤的效果

经 Endostatin 治疗后第 22 天,断颈处死小鼠,解剖取皮下肿瘤称重,并计算其抑瘤率。结果表明,Endostatin 治疗组低、中、高 3 个剂量组的瘤重及抑瘤率分别为(2.12 ± 0.92)g,(1.5 ± 0.68)g,(1.4 ± 0.61)g 和 38.2%,55.9%,58.8%,肿瘤对照组的瘤重及抑瘤率分别为(3.4 ± 1.02)g 及 0%,二者相比较有明显差异(P < 0.01)。

### 2.3 Lewis 肺癌肿瘤的转移观察

肿瘤对照组的 10 只鼠都有不同程度的脏器转移,以肺脏转移者为多,治疗组未发现转移。

### 2.4 病理检查

肿瘤对照组的切片中,可见明显的病理改变,肿瘤内部有大面积的坏死,肿瘤周围的毛细血管丰富;Endostatin 治疗组肿瘤局部可见明显地病理改变,但肿瘤的周围毛细血管消失,提示 Endostatin 对肿瘤新生毛细血管的形成具有明显地抑制作用(图 2)。

## 3 讨论

新生血管的内皮细胞遗传性状稳定,很少发生变异,因此针对血管内皮细胞来治疗肿瘤效果稳定。本研究结果显示,应用 Endostatin 可抑制小鼠 Lewis 肺癌肿瘤的生长和转移。

好,亦未发现脱毛、腹泻及体重减轻等现象,说明其无明显的毒副作用。但有些长时间多次注射的小鼠,在注射的局部可出现较小的硬结,但环磷酰胺治疗组小鼠的饮食极差,有脱毛,体重明显减轻,毒副作用很大。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutrc implication[ J ]. N End J Med, 1971, 285: 1182-1187.

[ 2 ] Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with vasculature: Angiogenesis and tumor mciastasis[ J ]. Biophys Acta, 1990,1032: 89-98.

[ 3 ] FolkmanJ, Klaysbum M. Angiogeneticfactor[ J ]. Science, 1987, 235: 442-448.

[ 4 ] Yamaoka M, Yamamoto T, Massakit H, *et al.* Inhibition of tumor growth and metastasis of rodent tumors by the angiogenesis inhibitor ( chloroacetyl-carbamoy ) fufmagillo ( TNP470, AGM-1470 )[ J ]. Cancer Res, 1993, 53: 4262-4272.

[ 5 ] O'Rilly MS, Boehm T, SingY, *et al.* Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[ J ]. Cell, 1997, 88: 277-285.

[ 6 ] 李忠义,汪军远,刘江秋,等. 重组人内皮细胞生长抑制因子-Endostatin的表达和纯化[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9( 2 ): 110-112.

[ 7 ] 李忠义,陈林生,等. 人血管内皮抑制素的基因克隆、表达及其抗肿瘤效应的研究[ C ]. 中华医学会辽宁分会第六次微生物免疫学术会议文汇编, 2000, 2-3.

[ 8 ] Weidener N, Carroll PR, Flax T, *et al.* Tumor angiogenes and metastasis correlation in invasive breast carcinoma[ J ]. Engl J Med, 1991, 324: 1-7.

[ 9 ] Mori S, Ueda T, Kuratsu S, *et al.* Suppression of puimmonary metastasis by angiogenesis inhibitor TNP-470 in murine osterosarcoma [ J ]. Int J Cancer, 1995, 61: 148-153.

[ 收稿日期 ] 2003 -05 -20 [ 修回日期 ] 2003 -06 -10

图 2 Endostatin 对瘤周毛细血管形成的抑制作用  
Fig. 2 Inhibitory effect of endostatin on capillary formation around tumor

A: Endostatin-treated group; B: Tumor control group

Endostatin 作用的直接靶点为瘤周新生毛细血管的内皮细胞,对其它细胞及正常静止的内皮细胞无抑制作用。本研究证实,Endostatin 可有效地抑制荷瘤小鼠新生毛细血管的形成,而对照组的毛细血管生长旺盛,这一结果与国外的报道相一致<sup>[8,9]</sup>。在治疗过程中,Endostatin 治疗组 3 个剂量组的小鼠均饮食状况良

· 书 讯 ·

《医学细胞与分子生物学》第 2 版出版

由陈诗书和汤雪明主编的《医学细胞与分子生物学》第 2 版,现已由科学出版社出版发行。

全书由 31 章组成,主要的特点是把医学细胞生物学和分子生物学的内容结合起来,既介绍了这两个学科的基本理论、知识和技术,又反映了各有关领域的最新进展,并对当前生命科学的一些研究热点如干细胞、转基因动物、肿瘤和艾滋病的分子基础、基因诊断、基因治疗和生物信息学等作专题介绍。

本书可用作医学院校研究生和进修生的教材,也可供教师、医学和科研人员参考。