

[文章编号] 1007-385X(2008)02-0120-05

内皮抑素基因对裸鼠移植骨肉瘤的抑制作用

林建华^{1*}, 张 俐², 吴朝阳¹, 黄 宇¹(1. 福建医科大学 附属第一医院 骨科, 福州 350005; 2. 福建中医学院 伤骨系, 福州 350108)

[摘 要] 目的: 探讨内皮抑素(endostatin, *ES*)基因对裸鼠骨肉瘤细胞 UMR106 移植瘤的抑制作用。方法: 携带 *ES* 基因重组质粒体外扩增后, 应用脂质体法转染骨肉瘤细胞 UMR106, Zeocin 抗性筛选得到 *ES*-UMR106 细胞。MTT 法观察 *ES* 基因对肿瘤细胞增殖的影响, ELISA 法检测转染后肿瘤细胞的 *ES* 分泌情况。MTT 法观察 *ES* 基因对血管内皮细胞增殖能力的影响。应用 *ES*-UMR106 和 UMR106 细胞制作裸鼠皮下移植瘤模型, 观察两组动物移植瘤生长情况、瘤组织的病理变化及肺转移的情况。结果: *ES* 基因转染不影响 UMR106 细胞的增殖能力; *ES*-UMR106 细胞可表达有生物活性的 *ES*, 转染后 48 h *ES* 在培养液中超过 350 ng/ml。ES-UMR106 细胞分泌的 *ES* 可明显抑制血管内皮细胞增殖。与 UMR106 细胞相比, *ES*-UMR106 细胞在裸鼠接种的移植瘤生长速度缓慢、包膜完整, 病理组织学显示瘤体内血管稀少, 肿瘤细胞广泛坏死; UMR106 细胞移植瘤裸鼠肺组织出现转移灶(2/8), *ES*-UMR106 细胞移植瘤裸鼠无肺转移灶。结论: 携带 *ES* 基因重组质粒转染骨肉瘤 UMR106 细胞后可抑制该骨肉瘤细胞移植瘤的生长和转移。

[关键词] 骨肉瘤; 内皮抑素基因; 基因治疗; 抗血管治疗

[中图分类号] R738.1; R730.54 [文献标志码] A

Inhibitory effect of endostatin gene on transplanted osteosarcoma in nude mice

LIN Jian-hua^{1*}, ZHANG Li², WU Zhao-yang¹, HUANG Yu¹(1. Department of Orthopaedics, the First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China; 2. Faculty of Orthopedics and Trauma, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of endostatin (*ES*) on the growth and metastasis of transplanted osteosarcoma UMR106 cells in nude mice. **Methods:** pBudCE4.1/*ES* was amplified and transfected into osteosarcoma cell line UMR106 through liposome; the non-transfected UMR106 cells were eliminated by Zeocin. The proliferation of *ES*-UMR106 cells was examined by MTT assay and the production of *ES* by *ES*-UMR106 cells was investigated by ELISA. The effects of *ES* on the *in vitro* proliferation of vascular endothelial cells were observed by MTT assay. Sixteen nude mice were randomly divided into 2 groups: one group was transplanted with UMR106 cells and the other with *ES*-UMR106 cells. The tumor size, pathological observation, tumor angiogenesis, and the pulmonary metastasis were observed. **Results:** The proliferation of UMR106 cells was not affected by *ES* transfection. *ES*-UMR106 cells expressed bioactive *ES*, and the *ES* level in the medium was higher than 350 ng/ml 48 h after transfection. *ES* produced by *ES*-UMR106 cells significantly inhibited the proliferation of vascular endothelial cells. Compared with UMR106 transplanted tumor, *ES*-UMR106 transplanted tumor grew slowly in nude mice, and the formed tumors was well-margined and had less angiogenesis and mass necrosis. Two of the 8 mice transplanted with UMR106 cells had pulmonary metastasis and no metastasis was found in *ES*-UMR106 transplanted group. **Conclusion:** Transfection with recombinant endostatin plasmid can inhibit the growth and metastasis of transplanted osteosarcoma in nude mice by inhibiting vascular endothelial cell proliferation.

[Key words] osteosarcoma; gene therapy; endostatin; anti-angiogenesis

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(2): 120-124]

[基金项目] 福建省卫生厅青年科研基金(No. 20070204); 福建省卫生教育联合攻关项目(No. WKJ2005-02-014); 福建医科大学教授基金项目(No. JS06031)。Supported by the Research Project of the Health Administration of Fujian Province(No. 20070204); Health and Education Research Project of Fujian Province(No. WKJ2005-02-014); the Professor Foundation of FMU(No. JS06031)

[作者简介] 林建华(1955-), 男, 福建省莆田县人, 主任医师, 硕士, 主要从事骨肿瘤、脊柱外科临床与基础方面的研究

* Corresponding author. E-mail: jianhua@126.com

骨肉瘤的生长和转移是血管生成(angiogenesis)依赖性的,内皮抑素(endostatin, ES)是一种能够强烈抑制血管生成的内源性抑制因子,特异性抑制内皮细胞和血管的增生,对原发性肿瘤和转移性肿瘤均有强烈的抑制作用^[1-3]。骨肉瘤是一种血运丰富的实体恶性肿瘤,是抗肿瘤血管生成研究的理想模型,然而应用ES基因治疗骨肉瘤的相关研究国内外鲜有报道,本研究初步探讨ES基因对骨肉瘤增殖、侵袭和转移的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

BALB/c(nu/nu)裸小鼠,共16只,4周龄,体重18~20g,购自中国科学院上海斯莱克实验动物有限责任公司[动物合格证号SCXK(沪)2003-0003],在福建省医学科学研究所动物实验中心SPF条件下饲养。大鼠原发性骨肉瘤UMR106细胞系,购于中科院上海细胞库。携带ES基因的pBudCE4.1/ES真核表达重组质粒由本院神经外科林志雄博士惠赠,同时带有Zeocin抗性筛选基因和绿荧光蛋白标记基因。RPMI 1640、M199培养基购自Gibco公司,0.25%胰蛋白酶购自Hyclone公司,MTT、Zeocin购自SIGMA公司,限制性内切酶Kpn I和Xho I购自Promega公司,脂质体转染试剂盒购自Invitrogen公司,ES ELISA试剂盒购自Biozyme,CO₂孵育箱购自HERAS公司。

1.2 细胞培养

骨肉瘤UMR106细胞的培养:RPMI 1640含10%胎牛血清,37℃、5%CO₂培养隔天换液,4d传代,计数后按 3×10^5 /ml培养。血管内皮细胞的培养:取本院产科足月健康新生儿脐带,无菌PBS冲洗3遍,脐静脉内注入0.1%Ⅱ型胶原酶10ml,37℃摇床上孵育20min后,含20%胎牛血清的M199反复冲洗静脉管壁,3000×g离心5min获得细胞,计数后以 3×10^5 /ml细胞密度培养,使用含20%胎牛血清M199培养液,隔天半量换液;Ⅷ因子FITC荧光抗体鉴定。本实验取第2代细胞。

1.3 质粒扩增提取和鉴定

按文献[4]方法对pBudCE4.1/ES真核表达重组质粒进行扩增、鉴定和提取备用。

1.4 重组质粒转染UMR106细胞

骨肉瘤UMR106细胞按 3×10^5 /ml传代培养,第2天观察细胞生长良好、细胞生长面积约占瓶底60%时用于ES基因转染。采用脂质体法,具体步骤参照lipofectamine说明书进行。转染后24h对细

胞抗性筛选,筛选培养基含Zeocin(1.0mg/ml),维持筛选30d,获得阳性克隆,扩增备用。转染后细胞命名为ES-UMR106。

1.5 MTT法检测ES对UMR106细胞增殖的影响

用含10%胎小牛血清的培养液分别将UMR106和ES-UMR106细胞配成单个细胞悬液,以每孔 1×10^5 个细胞接种到96孔板,每孔体积200μl,每12h检测1次,每孔重复3次,结果取3次的平均值。具体操作方法:每孔加MTT溶液(5mg/ml)20μl,继续孵育4h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加150μl DMSO,振荡10min,使结晶物充分溶解,选择490nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值,以时间为横坐标,光密度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.6 ELISA法检测ES-UMR106细胞体外分泌ES的情况

取ES-UMR106细胞,以 5×10^4 /孔培养于24孔板,每8h取0.5ml培养上清液用于ES浓度检测,共6次,每次重复4孔。ELISA法检测ES的具体步骤按照产品说明书操作。每个数据取4孔平均数,绘制ES-UMR106细胞的ES分泌曲线。

1.7 MTT法检测ES对血管内皮细胞增殖的影响

取ES-UMR106细胞按 3×10^5 /ml密度培养,培养液为含20%胎牛血清的M199(不含Zeocin),48h后吸取上清培养液,2000×g离心10min取上清,获取总量培养液50ml,与新鲜配制含20%胎牛血清的M199培养液等量混合,为内皮细胞的培养液(ES-UMR106-M199),ELISA法检测混合液的ES浓度。同样方法获得UMR106细胞的培养液(UMR106-M199)为对照。取上述培养的第二代血管内皮细胞,每孔 1×10^4 个细胞接种到96孔板,ES-UMR106-M199为实验组,UMR106-M199为对照组,MTT法绘制生长曲线,比较血管内皮细胞增殖情况。

1.8 通过移植瘤模型观察ES在体内对骨肉瘤UMR106细胞生长、侵袭的影响

BALB/c(nu/nu)裸小鼠共16只,分对照组和实验组,每组8只,以ES-UMR106细胞建成的肿瘤模型为实验组(ES-UMR106组),UMR106细胞建成的肿瘤模型为对照组(UMR106组)。调节细胞密度至 3×10^7 /ml,每只裸鼠腋部皮下注射细胞悬液100μl,注意注射细胞悬液时,注射器针头应该在皮下潜行一段距离,缓慢推注及拔针,拔针后局部稍按压,以免细胞漏出影响实验结果。每天观察动物的生存状态,比较成瘤率、成瘤时间,接种后第3、6、9、12、

15、18、21 d用游标卡尺测量肿瘤的长、短径,计算肿瘤的体积,肿瘤体积 = (长径 × 短径²)π/6^[5]。

第21天全部处死实验动物,观察肿瘤大体标本,常规固定,石蜡包埋,切片,HE染色观察肿瘤生长、坏死及血管生成情况,双玻片法检测全部实验动物双肺转移灶情况。

1.9 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS12.0 统计软件包对实验数据进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 重组质粒 pBudCE4.1/ES 扩增与鉴定结果

扩增重组质粒行 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切,出现大小为 >2 000 和约 700 bp 的两电泳条带(图1),与预期值相符,测序结果与已知序列完全一致。



图1 pBudCE4.1/ES 重组质粒扩增产物的酶切电泳鉴定
Fig.1 Electrophoresis of recombinant vector pBudCE4.1/ES digested by restriction edonuclease
M: Marker;1: pBudCE4.1/ES

2.2 ES 对骨肉瘤细胞 UMR106 生长的影响

骨肉瘤 UMR106 细胞增殖能力强,培养 3 d 后细胞贴壁生长汇合成单层,细胞呈多角形、大小均匀、形态规则一致,可见多个分裂相细胞。重组质粒 pBudCE4.1/ES 转染细胞后 6 h,部分细胞变圆、脱落、漂浮,高倍显微镜下可见小颗粒附着,36 h 后在荧光显微镜下可见绿荧光显色(图2);在条件培养液中部分细胞漂浮死亡,随换液吸弃,获得纯化的阳性克隆细胞;应用条件培养液培养未转染的 UMR106 细胞,细胞生长明显受到抑制,尤其是传代时细胞无法贴壁。ES-UMR106 与 UMR106 细胞在体外常规培养液培养时的增殖能力无明显差别。

2.3 ES-UMR106 细胞的 ES 蛋白分泌情况

ES-UMR106 细胞体外分泌 ES 度随培养时间延长而增加,ES 转染后 48 h 时 ES 在培养液中的质量浓度超过 350 ng/ml(图3)。

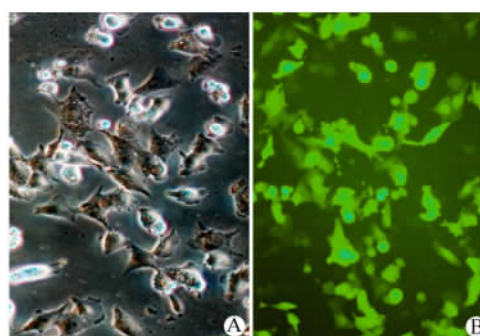


图2 ES 对骨肉瘤细胞 UMR106 生长形态的影响 (×100)
Fig.2 Effect of ES on morphosis of UMR106 cells(×100)
A:Some UMR106 cells were floated and dead 6 h after transfection;
B:Many GFP positive UMR106 cells were seen under fluorescence microscope 36 h after transfection

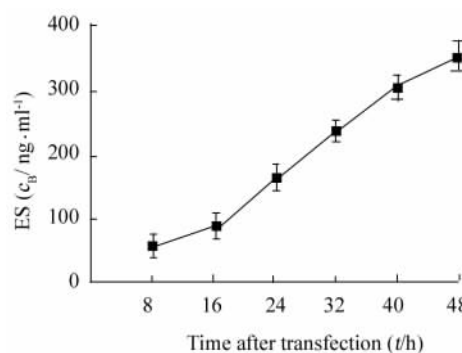


图3 ES-UMR106 细胞内皮抑素的分泌
Fig.3 Endostatin excreted by ES-UMR106 cells cultured *in vitro*

2.4 ES 对血管内皮细胞增殖的抑制作用

应用 ES-UMR106-M199(含 ES-UMR106-M199 226 ng/ml)、M199 及 UMR106-M199 培养液分别培养血管内皮细胞,不同培养液下血管内皮细胞的生长曲线如图4。无 ES 转染培养液因富含多种生长因子可明显促进内皮细胞生长;ES 转染的 UMR106 细胞培养液可抑制血管内皮细胞增殖,36 h 以后血管内皮细胞生长明显减慢($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.5 ES 对 UMR106 移植瘤生长、侵袭的抑制

移植瘤实验动物至观察终止无死亡,实验组与对照组裸鼠的致瘤率均为 100%。2 只对照组裸鼠出现明显消瘦、食欲减退等恶病质。从接种肿瘤细胞后第 9 天起,实验组裸鼠的肿瘤体积增加速度较对照组明显减慢($P < 0.05$, $P < 0.01$;表1)。对照组

动物的肿瘤呈分叶状生长,表面明显静脉曲张,瘤体固定,并侵犯粘连胸壁及上肢。2 只出现恶病质的裸鼠解剖发现肺转移灶,其他对照组和实验组的裸鼠均未发现肺转移灶。病理组织学观察发现实验组瘤体内血管稀少,肿瘤组织广泛坏死;对照组瘤体内血管丰富,瘤组织内存在大量微动脉和微静脉,微静脉内可见瘤细胞团,瘤细胞团周围出现由内皮细胞包裹形成的癌栓,肿瘤细胞形态学良好(图5)。

3 讨论

抗血管生成(angiogenesis)是肿瘤治疗学研究的新热点^[6],肿瘤的生长和转移均是血管生成依赖性的,抑制肿瘤的血管生成从而阻断肿瘤的营养供给和转移可望成为治疗肿瘤的新方法。

表1 ES对移植骨肉瘤的抑制作用($\bar{x} \pm s, V/mm^3$)

Tab.1 Inhibitory effect of ES gene on transplanted osteosarcoma ($\bar{x} \pm s, V/mm^3$)

Group	Time after implantation(t/d)						
	3	6	9	12	15	18	21
UMR106	65 ± 5	125 ± 9	240 ± 23	439 ± 41	689 ± 39	901 ± 62	989 ± 59
ES-UMR106	63 ± 2	106 ± 6	163 ± 16*	221 ± 19**	301 ± 29**	421 ± 26**	569 ± 50**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs UMR106 group

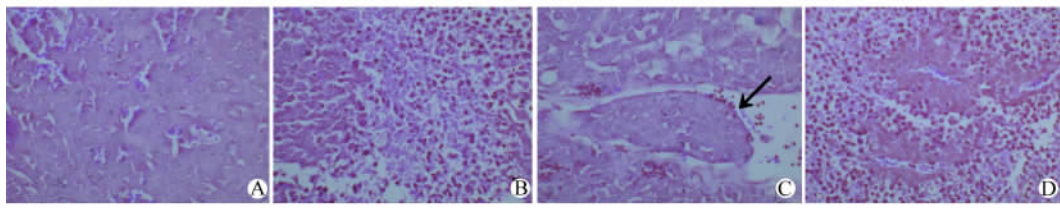


图5 ES基因抑制UMR106细胞移植瘤生长和侵袭的病理观察(×400)

Fig.5 Inhibitory effects of ES gene on growth and invasion of transplanted UMR106 tumors(×400)

A: Twelve days after UMR106 cells transplantation many newly generated vessels were seen in the osteosarcoma, no necroses were found; B: Twelve days after ES-UMR106 cells transplantation few blood vessels were seen in the osteosarcoma, lamellar necroses were observed; C: Eighteen days after UMR106 cells transplantation tumor emboli were seen in small venous (arrow); D: Eighteen days after ES-UMR106 cells transplantation large necroses area formed in the center of tumor, few tumor cells were found around blood vessel

ES是目前已知最强的内源性血管生成抑制因子,其主要功能是特异性抑制内皮细胞的增生和血管生成,对原发肿瘤和转移性肿瘤均有强烈的抑制作用^[7]。多项研究^[8-12]报道了ES在体内和体外的抗肿瘤作用,其在甲状腺癌、肝癌、乳腺癌、直肠癌等多种肿瘤的实验中均显示了良好的疗效。骨肉瘤患者血循环中ES浓度与肿瘤在体内的复发和转移呈正相关。本研究所应用的大鼠ES基因真核表达系统,前期的实验已证实在大鼠胶质瘤细胞系中可成功表达并分泌有活性的ES^[4]。在体外应用脂质体法基因转染获得ES基因表达阳性的骨肉瘤细胞,

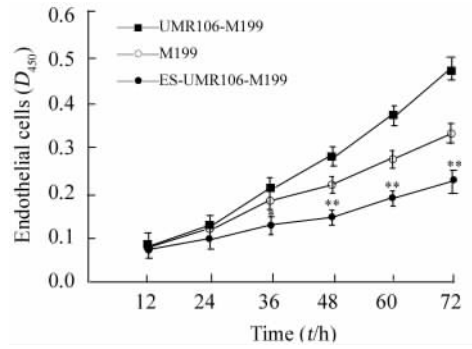


图4 ES对血管内皮细胞增殖的抑制作用

Fig.4 Effect of ES gene on proliferation of vascular endothelial cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs UMR106-M199

经抗性筛选及绿荧光蛋白标记鉴定为转染成功的ES-UMR106细胞。对ES-UMR106细胞进行体外培养扩增,证明ES-UMR106细胞可分泌ES蛋白,且其分泌ES的水平随培养时间的延长而增高,到48h时培养液中ES超过350 ng/ml,大大超过文献报道的ES在体外抑制血管生成的有效浓度^[13]。比较UMR106和ES-UMR106细胞在体外的增殖情况,结果显示ES基因转染后骨肉瘤UMR106细胞的增殖能力并无明显改变。本研究进一步探讨ES-UMR106细胞分泌的ES对血管内皮细胞增殖的作用,结果显示ES转染后的UMR106细胞培养液可

明显抑制血管内皮细胞的增殖,表明本实验转染 *ES* 基因的骨肉瘤 UMR106 细胞表达的 *ES* 不仅可达到有效浓度,而且在体外具有生物学活性。

ES 可抑制血管生成从而抑制骨肉瘤的生长。研究^[14]表明肿瘤体积小于 0.5 mm^3 时,肿瘤的营养供给主要依靠组织液的渗透弥散作用,此时肿瘤处于隐匿期。当肿瘤生长直径大于 2 mm^3 时,这种平衡被打破,肿瘤细胞因缺血缺氧转变为诱导血管生成的表型,可分泌大量促血管生成活性分子,诱导肿瘤血管形成,为肿瘤细胞输送营养物质、清除各种代谢产物。本研究应用局部注射法在裸鼠皮下成功建立骨肉瘤动物模型,实验与对照组皮下成瘤率均为 100%,注射后肿瘤在体内生长迅速,第 3 天可触及瘤体。对照组第 6 天可见瘤体体积大,表面血管多见;病理组织学研究发现瘤体周边组织内血管网丰富,肿瘤细胞形态学良好,无明显坏死区,但瘤体中心血管较少,可见少数片状缺血性坏死区。实验组肿瘤体积明显较小,表面血管少见;病理学观察可见血管稀少,血管缺少处多数成片状肿瘤坏死区。提示在本实验中 *ES* 基因可抑制骨肉瘤血管生成,从而抑制骨肉瘤的生长。

ES 可抑制血管生成从而抑制骨肉瘤的侵袭和转移。骨肉瘤是血运十分丰富的恶性实体肿瘤,其转移途径主要经血行转移。研究表明大于 80% 有症状的患者就诊时已发生肺转移,其转移率与微血管密度呈正相关^[15-17]。肿瘤内大量新生血管不仅为肿瘤细胞提供营养物质,而且有利于脱落的肿瘤细胞沿血行向其他组织器官的转移。本研究建立的皮下移植瘤对照组中,肿瘤组织广泛侵犯胸壁和上肢,2 只实验动物出现恶病质且肺部发现转移灶。病理观察发现瘤细胞团周围存在由内皮细胞包裹形成癌栓(图 5),这些癌栓极易通过血液循环形成肺部转移,生动再现了肿瘤通过血管离开原发部位形成转移的过程。而在实验组中肿瘤外表包膜完整,胸壁无明显侵袭,组织学观察显示肿瘤内皮血管较少,无明显癌栓形成。提示 *ES* 基因可抑制骨肉瘤血管生成,从而抑制骨肉瘤的侵袭和转移。

总之,上述研究表明,*ES* 在体外可抑制血管内皮细胞生长,在体内可抑制骨肉瘤移植瘤的生长、侵袭和转移,*ES* 基因可望作为骨肉瘤综合治疗的组成部分。

[参 考 文 献]

[1] Kaya M, Wada T, Nagoya S, *et al.* Revention of postoperative progression of pulmonary metastases in osteosarcoma by antiangiogenic therapy using endostatin[J]. *J Orthop Sci*, 2007, 12(6): 562-567.

- [2] Li X, Liu YH, Lee SJ, *et al.* Prostate-restricted replicative adenovirus expressing human endostatin-angiostatin fusion gene exhibiting dramatic antitumor efficacy[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(1): 291-299.
- [3] Li HL, Li S, Shao JY, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intratumoral injection of an adenovirus encoding endostatin in patients with advanced tumors[J]. *Gene Ther*, 2008, 15(4): 247-256.
- [4] 杨丽娟,翁绳美,陈崇宏,等.大鼠 ESCDNA 真核表达载体的构建及 C6 细胞上的分泌表达[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(1): 71-75.
- [5] 王 臻,李华林,孙 峥.人骨肉瘤原位移植模型的建立及生物学特性[J]. *中国骨肿瘤骨病*, 2002, 1(1): 38-42.
- [6] Mellon MJ, Ahn M, Jimenez JA, *et al.* Anti-angiogenic gene therapy for metastatic renal cell carcinoma produces tumor growth suppression in an athymic nude mouse model[J]. *J Urol*, 2008, 179(2): 737-742.
- [7] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(6 Suppl 16): 15-18.
- [8] Yokoyama Y, Sedgewick G, Ramakrishnan S. Endostatin binding to ovarian cancer cells inhibits peritoneal attachment and dissemination[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10813-10822.
- [9] Liu F, Tan G, Li J, *et al.* Gene transfer of endostatin enhances the efficacy of doxorubicin to suppress human hepatocellular carcinomas in mice[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(9): 1381-1387.
- [10] Li J, Dong X, Xu Z, *et al.* Endostatin gene therapy enhances the efficacy of paclitaxel to suppress breast cancers and metastases in mice[J]. *J Biomed Sci*, 2008, 15(1): 99-109.
- [11] Hoffmann S, Wunderlich A, Celik I, *et al.* Paneling human thyroid cancer cell lines for candidate proteins for targeted anti-angiogenic therapy[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98(4): 954-965.
- [12] Li X, Liu YH, Lee SJ, *et al.* Prostate-restricted replicative adenovirus expressing human endostatin-angiostatin fusion gene exhibiting dramatic antitumor efficacy[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(1): 291-299.
- [13] Dubois S, Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma[J]. *Cancer*, 2007, 109(5): 813-819.
- [14] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 401-410.
- [15] Mikulic D, Ilic I, Cepulic M, *et al.* Tumor angiogenesis and outcome in osteosarcoma[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2004, 21(7): 611-619.
- [16] Kreuter M, Bieker R, Bielack SS, *et al.* Prognostic relevance of increased angiogenesis in osteosarcoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(24): 8531-8537.
- [17] Kaya M, Wada T, Akatsuka T, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(2): 572-577.

[收稿日期] 2007 - 12 - 31

[修回日期] 2008 - 02 - 22

[本文编辑] 韩 丹