

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.05.013

重组人血管内皮抑素联合重组人 P53 腺病毒对裸鼠乳腺癌移植瘤的抑制

赵广章, 戚晓东*, 常志坤 (首都医科大学 附属北京同仁医院 肿瘤中心, 北京 100730)

[摘要] 目的: 探讨重组人血管内皮抑素(recombinant human endostatin, ES)联合重组人 P53 腺病毒(rAd/P53)对乳腺癌细胞 MCF-7 裸鼠移植瘤的抑制作用。方法: 建立裸鼠荷人乳腺癌模型, 随机分为对照组、ES 组、rAd/P53 组和两药联合组, 分别给予相应治疗; 观察肿瘤生长, 免疫组化法检测肿瘤组织微血管密度(microvessel density, MVD)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达。结果: 各治疗组均可明显抑制移植瘤生长, ES 组、rAd/P53 组和联合用药组的抑瘤率分别为 51.67%、48.74% 和 75.54%, 联合用药组抑瘤作用最为显著($P < 0.05$)。对照组、ES 组、rAd/P53 组与联合用药组的移植瘤组织 MVD 分别为 31.17 ± 2.48 、 20.33 ± 4.84 、 22.33 ± 3.88 及 12.50 ± 2.74 , VEGF 表达 H 评分分别为 45.33 ± 5.89 、 35.83 ± 5.46 、 33.67 ± 4.80 及 22.33 ± 4.41 , 联合用药组的 MVD 和 VEGF 表达显著低于其余各组($P < 0.01$)。结论: 重组人 ES 联合 rAd/P53 治疗可显著抑制裸鼠乳腺癌移植瘤的生长及微血管生成。

[关键词] 内皮抑素; 腺病毒; P53; 乳腺癌; 移植瘤; 裸小鼠

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)05-0470-04

Inhibitory effect of recombinant human endostatin combined with rAd/P53 on transplanted human breast cancer in nude mice

ZHAO Guang-zhang, QI Xiao-dong*, CHANG Zhi-kun (Centre of Tumor, Tongren Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of recombinant human endostatin (ES) combined with rAd/P53 on transplanted human breast cancer cell MCF-7 in nude mice. **Methods:** Animal breast cancer model was established by inoculating MCF-7 cells in nude mice. The animals were randomized into control group, ES group, rAd/P53 group, and ES + rAd/P53 group. The tumor growth was observed in each group and immunohistochemical method was employed to examine the microvessel density (MVD) and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF). **Results:** Tumor growth was significantly inhibited in all the 3 treatment groups ($P < 0.05$), with the inhibitory rates being 51.67%, 48.74% and 75.54% in ES, rAd/P53, and ES + rAd/P53 group, respectively. The value of MVD in control, ES, rAd/P53, and ES + rAd/P53 group were 31.17 ± 2.48 , 20.33 ± 4.84 , 22.33 ± 3.88 and 12.50 ± 2.74 , respectively; and their VEGF H-scores were 45.33 ± 5.89 , 33.67 ± 4.80 , 40.17 ± 4.74 and 22.33 ± 4.41 , respectively. The MVD value and VEGF expression in the ES + rAd/P53 group were significantly lower than those of the other groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Recombinant human endostatin combined with rAd/P53 can greatly inhibit the growth of transplanted human breast tumor in nude mice and reduce the formation of capillary.

[Key words] endostatin; adenovirus; P53; breast neoplasms; nude mice

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(4): 470-473]

乳腺癌是目前严重威胁女性健康最常见的恶性肿瘤之一, 在美国约 12% 的女性患乳腺癌, 即每 8 位女性中就有 1 人患乳腺癌^[1]。随着外科技术、放疗、化疗、内分泌治疗以及生物靶向治疗的进步与完善, 治疗效果有了一定的提高。但由于肿瘤的发生、发展是一个多基因、多阶段的过程, 单一的治疗途径往往不能奏效, 而多基因、多靶点、早期联合用药可能有更好的疗效。重组人血管内皮抑素是一种广

谱、多靶点的血管生成抑制剂。P53 基因在人类乳腺癌的突变率为 20% ~ 60%^[2], 重组人 P53 腺病毒

[基金项目] 首都医学发展科研基金联合攻关项目(No. 2005-1-161)。Supported by the Capital Medical Development Foundation of Beijing (No. 2005-1-161)

[作者简介] 赵广章(1980-), 男, 山东省泰安市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤外科及生物治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail: qixiaot@yeah.net

通过转染宿主细胞将野生型 P53 基因导入肿瘤细胞内,从基因层面上抗肿瘤,并被称为一种化疗增敏剂。本课题以重组人 P53 腺病毒联合重组人血管内皮抑素治疗乳腺癌细胞裸鼠移植瘤,观察其疗效,为临床联合用药治疗乳腺癌提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国医学科学院肿瘤研究所。RPMI 1640 培养基购自北京天润善达公司。BALB/c 裸鼠,雌性,4~6 周龄,16~19 g,购于北京实验动物研究所[动物实验合格证号 SCXK(京)2005-0013],SPF 环境饲养。重组人血管内皮抑素(recombinant human endostatin injection, EN-DOSTAR 恩度),15 mg/支,4℃避光保存,先声药业提供,批准文号为国药准字 S20050088。重组人 P53 腺病毒注射液(recombinant adenovirus P53;今又生, genticine), 1×10^{12} VP/支,-20 度保存,由深圳赛百诺公司提供,批准文号为国药准字 S20040004。兔抗人 VIII 因子抗体及鼠抗人 VEGF 单克隆抗体及相关试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 制备人乳腺癌细胞裸鼠移植瘤模型

将人乳腺癌 MCF-7 细胞株置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。传代至足够数量后,取指数生长期乳腺癌细胞,0.25% 胰酶消化,用 PBS 液配置成 4.0×10^7 /ml 的细胞悬液,裸鼠右侧第二乳头下乳垫接种 0.05 ml,共 24 只。

1.3 实验分组及给药方法

肿瘤细胞种植成功后将 24 只裸鼠随机分为 4 组,每组 6 只,分别设为对照组、ES 组、rAd/P53 组、ES+rAd/P53 组。自种植肿瘤后第 3 日起用药,ES 组每日背部皮下注射 400 μg,连用 2 周;rAd/P53 组成瘤后瘤内隔日注射 5×10^{10} VP/只,共 6 次;联合组两种制剂用法用量同单药治疗;对照组以等量生理盐水代替药物治疗,给药时间及途径相同。

1.4 测量移植瘤体积计算治疗后的抑瘤率

自给药第 16 天起,每隔 2 d 测量 1 次肿瘤长短径,并据公式 $V = 1/2ab^2$ (a 为长径,b 为短径)计算肿瘤体积,得出各组的肿瘤生长曲线并计算用药后的抑瘤率。

1.5 免疫组织化学检测移植瘤组织 MVD 及 VEGF 的表达

组织标本以 10% 甲醛溶液固定 24 h,常规石蜡包埋,制备 5 μm 厚切片,按免疫组化操作规程进

行。用已知阳性标本作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。MVD 计数,先在低倍镜下寻找新生血管最密集区,即“热点”(hot spot),继而在高倍镜下观察染成棕色的单个细胞和细胞丛,并以此作为一个血管;血管腔和腔内的红细胞不计数;以 5 个高倍视野($\times 200$ 倍)血管的均数表示微血管数。

VEGF 阳性染色位于细胞质,呈棕黄色,结果采用半定量分析方法进行 H 评分^[3-4]:对每一个切片随机选取 5 个高倍镜视野($\times 400$)计数 200 个细胞,在光镜下判断其胞质的 DAB 染色强度,分别以 0、1、2、3 代表阴性、弱染色、中等染色及强染色等 4 个等级,H 分值=(弱染色强度细胞百分数 $\times 1$)+(中度染色程度细胞百分数 $\times 2$)+(强染色强度细胞百分数 $\times 3$),H 值得分介于 0~300 之间。

1.6 统计学处理

采用 spss11.5 软件包,各实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,采用单因素方差分析并做两两比较。

2 结 果

2.1 ES 联合 rAd/P53 对乳腺癌移植瘤生长的抑制

人乳腺癌 MCF-7 细胞种植于裸鼠右侧第二乳头乳垫下,第 11 天左右种植区出现小节结,成瘤率 100%。自第 16 日起测量肿瘤体积,观察至第 43 天,绘出生长曲线(图 1)。对照组、ES 组、rAd/P53 组和联合组终末体积分别为(427.98 ± 67.82)、(206.82 ± 104.20)、(219.37 ± 63.01)、(104.70 ± 39.32) mm³,ES、rAd/P53、ES+rAd/P53 治疗的抑瘤率分别为 51.67%、48.74% 和 75.54%,各治疗组与对照组相比明显抑制肿瘤生长($P=0.000$),联合用药组显著优于单药 ES 组、rAd/P53 组($P=0.024$ 和 $P=0.013$)。

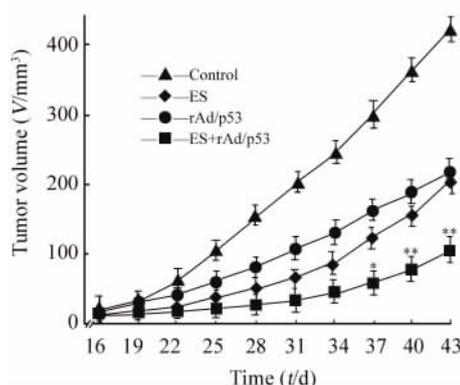


图 1 ES 联合 rAd/P53 对裸鼠 MCF-7 移植瘤生长的抑制
Fig. 1 Inhibitory effect of ES combined with rAd/P53 on graft model of human breast cancer MCF-7 in nude mice

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs control or ES or rAd/P53

2.2 ES 联合 rAd/P53 对 MCF-7 移植瘤组织 MVD 及 VEGF 表达的影响

H-E 染色发现各组肿瘤中心可见肿瘤坏死, 以联合组尤为明显。免疫组化检测 MVD(图 2), 发现对照组微血管数明显高于其余各实验组, 联合用药组 MVD 低于 ES 与 rAd/P53 单药治疗组 ($P < 0.01$)。VEGF 蛋白阳性表达于胞质(图 3), 采用 H 评分, 对照组 VEGF 表达强度高于各用药组 ($P < 0.01$), 联合治疗组 VEGF 表达强度最小, 评分明显低于 ES 和 rAd/P53 单药治疗组 ($P < 0.01$, 表 1)。

3 讨论

肿瘤的生长、浸润和转移与新生血管密切相关, 实体肿瘤形成后即进入无血管的浸润前期, 此时结节直径一般小于 2~3 mm, 细胞数在 1×10^7 以内, 肿瘤细胞主要靠弥散供给营养^[5]。当直径增大超过 2~3 mm, 肿瘤需要新生血管维持营养供给、排泄代谢产物和提供转移的通道。MVD 是衡量血管生成的定量指标, 与多种肿瘤的生长、转移相关^[6]。肿瘤血管的生成受多种调节因子的影响, 主要的促进因子有 VEGF、成纤维细胞生长因子(bFGF)、TGF α/β 、雌激素、雄激素、前列腺素等^[7], 其中最为

重要的是 VEGF。血管生成的始动需要血管生成因子^[8], 研究^[9]表明多数肿瘤中 VEGF 的表达与血管密度、恶性度呈正相关, 即 VEGF 的表达越高肿瘤的恶性程度越高。通过抑制肿瘤血管的生成治疗肿瘤已成为肿瘤治疗的一种重要手段。已有动物实验^[10]表明, 通过转染入抑制血管生成基因可提高紫杉醇抑制远处转移的效果。

表 1 ES 联合 rAd/P53 对 MCF-7 移植瘤 MVD 和 VEGF 表达的抑制

Tab. 1 Inhibitory effect of ES combined with rAd/P53 on MVD and VEGF in exnograf tumor of MCF-7 in nude mice

Group	MVD	VEGF
Control	31.17 \pm 2.48	45.33 \pm 5.89
ES	20.33 \pm 4.84	35.83 \pm 5.46
rAd/P53	22.33 \pm 3.88	33.67 \pm 4.80
ES + rAd/P53	12.50 \pm 2.74**	22.33 \pm 4.41**

** $P < 0.01$ vs control or ES or rAd/P53 group

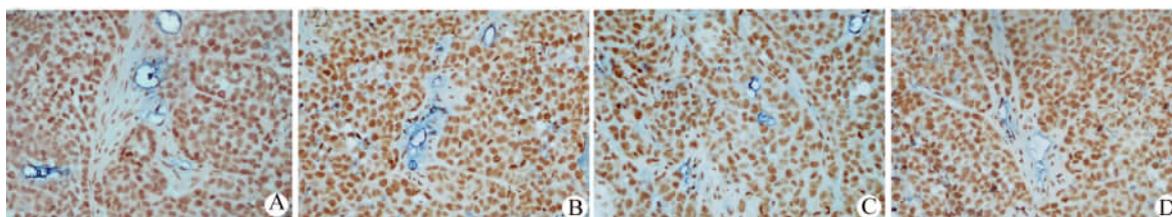


图 2 ES 联合 rAd/P53 对各组 MCF-7 移植瘤 MVD 的抑制(DAB, $\times 200$)

Fig. 2 Inhibitory effect of ES combined with rAd/P53 on MVD in exnograf tumor of MCF-7 in nude mice

A: Control ; B: ES ; C: rAd/P53 ; D: ES + rAd/P53

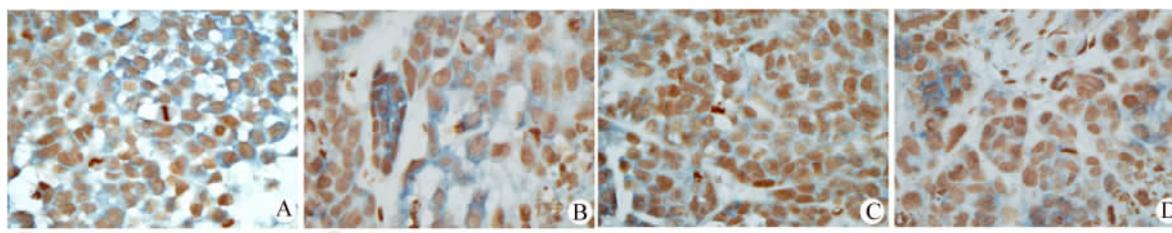


图 3 ES 联合 rAd/P53 对各组 MCF-7 移植瘤 VEGF 表达的抑制(DAB, $\times 400$)

Fig. 3 Inhibitory effect of ES combined with rAd/P53 on VEGF in exnograf tumor of MCF-7 in nude mice

A: Control; B: ES; C: rAd/P53 ; D: ES + rAd/P53

重组人血管内皮抑素是新应用于临床的抑制肿瘤血管生成的抗肿瘤生物制剂, 与阿瓦斯丁

等血管抑制剂不同的是, 它通过抑制 VEGF、bFGF、Neuropilin 等^[11-12]促血管生成因子多条途径

抑制肿瘤血管生成。已有临床研究表明,其与化疗药物联合使用治疗肺癌以外的多种晚期恶性肿瘤具有良好的疗效;重组人血管内皮抑素联合 NP 方案治疗晚期 NSCLC 的Ⅲ期临床研究表明其具有很好的临床应用前景^[13]。rAd/P53 是目前基因治疗肿瘤的药物,研究表明 P53 基因导入肿瘤细胞,不仅可以使肿瘤细胞周期阻滞和凋亡,还可以降低肿瘤组织微血管生成^[14-15]。肿瘤的发展是一个多阶段的过程,当肿瘤较大或晚期肿瘤治疗效果往往不佳,因此,联合两种生物制剂多靶点,多途径早期治疗乳腺癌可能疗效更佳。

本实验联合重组人血管内皮抑素与 rAd/P53 治疗裸鼠乳腺癌移植瘤,观察其抗肿瘤效果。通过观察肿瘤生长曲线及终末体积,显示各治疗组都可以抑制肿瘤生长,但联合治疗组效果更为显著,可以明显抑制肿瘤的生长。可能与 rAd/P53 可以促进肿瘤细胞凋亡,降低了肿瘤负荷有关;同时 rAd/P53 还可以减少微血管生成,可能与重组人血管内皮抑素有协同作用。本实验还观察了重组人血管内皮抑素联合 rAd/P53 对裸鼠乳腺癌 VEGF 的表达和微血管密度的影响,结果显示,各治疗组给药均可降低肿瘤组织微血管密度及 VEGF 表达,但联合治疗组效果明显强于单药治疗组。重组人血管内皮抑素为一种广谱的血管抑制剂,可以抑制多种血管生成因子的表达,尤其是 VEGF。rAd/P53 也有一定的抗血管生成作用,可能与能诱导细胞凋亡,减少了肿瘤负荷,从而减少了肿瘤细胞表达的血管生长因子,其是否在基因水平抑制肿瘤血管生成及与重组人血管内皮抑素联合用药后效果明显增强的机制尚需进一步探讨。总之,早期联合重组人血管内皮抑素和 rAd/P53 可显著抑制肿瘤血管生成,从肿瘤细胞基因水平和肿瘤血管生成两方面靶点联合治疗效果更显著。

本研究结果表明,早期联合重组人血管内皮抑素和重组人 P53 腺病毒可明显抑制裸鼠乳腺癌移植瘤生长,抑制肿瘤血管的生成,两者之间可能存在协同作用,为下一步临床联合使用重组人血管内皮抑素和 rAd/P53 治疗乳腺癌提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] 潘 昊. 肿瘤血管生成及抗血管生成的临床应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(2): 133-136.
- [3] Shenton KC, Dowsett M, Lu Q, *et al.* Comparison of biochemical aromatase immunohistochemistry in human breast carcinomas [J]. Breast Cancer Res Treat, 1998, 49(suppl 1)S101-107; 109-119.
- [4] Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, *et al.* Semi-quantitative immunohistochemical analysis of aromatase expression in ductal carcinoma in situ of the breast [J]. Breast Cancer Res Treat, 2002, 74(1): 47-53.
- [5] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication [J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [6] Giatromanolaki A, Sivridis E, Brekken R, *et al.* The angiogenic "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR) receptor" pathway in patients with endometrial carcinoma: prognostic and therapeutic implications [J]. Cancer, 2001, 92(10): 2569-2577.
- [7] Nelson NJ. Angiogenesis research is on fast forward [J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(10): 820-822.
- [8] Boehm-Viswanathan T. Is angiogenesis inhibition the Holy Grail of cancer therapy [J]. Curr Opin Oncol, 2000, 12(1): 89-94.
- [9] Proniewska-Skrettek E, Mariak Z. Tumor angiogenesis in uveal melanoma. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) [J]. Klin Oczna, 2004, 106(4-5): 682-685.
- [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] 秦叔逵,刘秀峰,王 琳,等. 重组人血管内皮抑素与化疗联合治疗肺外晚期恶性肿瘤的临床研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12(10): 728-735.
- [12] 林建华,张 俐,吴朝阳,等. 内皮抑制素基因对裸鼠移植骨肉瘤的抑制作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(2): 120-124.
- [13] 王金万,孙 燕,刘永煜,等. 重组人血管内皮抑素联合 NP 方案治疗晚期 NSCLC 随机、双盲、对照、多中心Ⅲ期临床研究 [J]. 中国肺癌杂志, 2005, 8(4): 283-290.
- [14] 陈思曾,吕新生,林永堃. 野生型 P53 基因对肝癌细胞裸鼠皮下移植瘤及其血管生成的影响 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9(2): 68-72.
- [15] 肖绍文,颜 博,杨敬贤,等. 外源 P53 基因和抗血管生成小肽 F56 联合对小鼠乳腺癌移植瘤生长和转移的抑制作用 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2007, 39(2): 171-176.

[收稿日期] 2008-06-26

[修回日期] 2008-09-01

[本文编辑] 韩 丹