

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.02.017

## PI-88 抑制人食管癌 TE-13 细胞 Matrigel 裸鼠移植瘤血管新生及其机制

朱辉<sup>1</sup>, 何明<sup>1</sup>, 单保恩<sup>2</sup>, 时高峰<sup>3</sup>, 王士杰<sup>4</sup> (1. 河北医科大学第四医院 胸外科, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011; 3. 河北医科大学第四医院 CT 室, 河北 石家庄 050011; 4. 河北医科大学第四医院内窥镜室, 河北 石家庄 050011)

**[摘要]** **目的:** 探讨通过 Matrigel 与肿瘤细胞混合接种的方法构建裸鼠人食管癌 Matrigel 移植瘤模型的可能性, 进一步研究抗肿瘤制剂 PI-88 对于人食管癌 Matrigel 移植瘤生长及血管新生的影响。 **方法:** 将食管鳞癌细胞株 TE-13 悬液与 Matrigel 胶混合, 接种 8 只裸鼠, 构建人食管癌 TE-13 细胞 Matrigel 裸鼠移植瘤模型, 将其随机分为 PI-88 治疗组和对照组。治疗组按照 20 mg/kg 剂量皮下注射 PI-88, 1 次/d (PI-88 配成 1 mg/ml 溶液); 对照组按照 20 ml/kg 注射生理盐水, 1 次/d, 均连续给药 2 周。第 2、6、10、14 天记录裸鼠肿瘤体积, 第 15 天进行增强 CT 扫描观察肿瘤区域显影情况。免疫组化染色观察肿瘤组织中乙酰肝素酶 (heparanase, HPSE) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达。 **结果:** 8 只裸鼠均在接种当天形成移植瘤, 成功构建 TE-13 细胞 Matrigel 裸鼠移植瘤模型。PI-88 治疗第 14 天时, 治疗组肿瘤体积明显小于对照组 [ (70.25 ± 6.85) vs (143.13 ± 17.18) mm<sup>3</sup>,  $P < 0.05$  ]。治疗第 15 天时, 治疗组肿瘤区域 CT 值明显低于对照组 (15.18 ± 0.91 vs 19.23 ± 2.03,  $P < 0.05$ )。治疗组肿瘤组织内 HPSE 与 VEGF 表达阳性细胞数显著低于对照组 [ HPSE: (28.70 ± 6.39) vs (87.55 ± 22.03) 个,  $t = 11.472$ ,  $P < 0.01$ ; VEGF: (47.10 ± 8.18) vs (94.40 ± 14.47) 个,  $t = 12.727$ ,  $P < 0.01$  ]。 **结论:** Matrigel 胶混合食管癌细胞接种裸鼠制备移植瘤方法可行, PI-88 能够抑制人食管癌 TE-13 细胞 Matrigel 裸鼠移植瘤生长及血管新生, 其作用机制可能与 PI-88 抑制移植瘤组织中 HPSE 和 VEGF 表达有关。

**[关键词]** 食管癌; 裸鼠; 血管新生; PI-88; Matrigel; 乙酰肝素酶; 血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R735.1; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)02-0236-04

## Roles and mechanisms for PI-88 in esophageal tumor growth and angiogenesis: Evaluation in nude mouse model created by coinjection of tumor cells with matrigel

Zhu Hui<sup>1</sup>, He Ming<sup>1</sup>, Shan Baoen<sup>2</sup>, Shi Gaofeng<sup>3</sup>, Wang Shijie<sup>4</sup> (1. Department of Thoracic Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 3. Department of CT Image, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 4. Department of Endoscopy, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To create a mouse xenograft model of esophageal squamous cancer by coinjection of tumor cells with matrigel and to determine the anti-tumor and anti-angiogenic effects of PI-88 using this model. **Methods:** Nude mice were co-injected with human esophageal cancer TE-13 cells and matrigel subcutaneously. They were then randomized to receive subcutaneously physical saline ( $n = 4$ , 20 ml/[kg · day]) as controls and PI-88 ( $n = 4$ , 20 mg/[kg · day]) as test treatment, respectively. At day 2, 6, 10, 14 d after the last dose, contrast enhanced CT scans were performed on the xenograft region and xenograft tumor specimens were collected for analyses of heparanase (HPSE) and vascular endothelial growth factor (VEGF), respectively, by S-P staining and histoimmunological staining. **Results:** Xenograft tumors were formed on the same day of tumor cell injection in 8 mice. On post-treatment d 14, the volume of xenograft tumors was sig-

**[基金项目]** 河北省卫生厅重点科研项目资助 (No. 20120130)。Project supported by the Science Research Foundation from the Bureau of Health of Hebei Province (No. 20120130)

**[作者简介]** 朱辉 (1977 - ), 男, 石家庄市人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事胸部恶性肿瘤的基础与临床研究, E-mail: zhdzuj@sina.com

**[通信作者]** 朱辉 (Zhu Hui, corresponding author), E-mail: zhdzuj@sina.com

nificantly reduced in the PI-88 treatment group ( $70.25 \pm 6.85 \text{ mm}^3$ ) than in the I-88 treatment group ( $143.13 \pm 17.18$ ) ( $P < 0.05$ ). On d 15, CT value was significantly lower in the PI-88 treatment group ( $15.18 \pm 0.91 \text{ mm}^2$ ) than in the control group ( $19.23 \pm 2.03 \text{ mm}^2$ ) ( $P < 0.05$ ), and staining signals for both HPSE ( $28.70 \pm 6.39$  vs  $87.55 \pm 22.03$ ,  $P < 0.01$ ) and VEGF ( $47.10 \pm 8.18$  vs  $94.40 \pm 14.47$ ,  $P < 0.01$ ) in the control group than in the treat group. **Conclusions:** Co-injection of xenograft tumor cells with matrigel may offer a reliable and more efficient approach of establishing animal models of esophageal cancer. PI-88 may inhibit esophageal tumor growth and angiogenesis, possibly, through VEGF- and HPSE-dependent mechanisms.

[ **Keywords** ] esophageal neoplasms; nude mice; angiogenesis; PI-88; matrigel; heparanase; VEGF

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(2): 236-239 ]

PI-88 是新近合成的硫酸化寡聚糖混合物,是针对乙酰肝素酶(heparanase, HPSE)的靶向抑制剂,它可显著降低组织中 HPSE 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,具有较强的抗肿瘤转移及抗血管生成作用<sup>[1-3]</sup>。目前,国外正在进行 PI-88 单药或联合化疗治疗黑色素瘤、前列腺癌和肝癌的临床试验<sup>[4-7]</sup>,但迄今为止未见 PI-88 应用于食管肿瘤的研究报道。本研究采用 Matrigel 基质胶混合食管癌细胞悬液建立食管癌裸鼠移植瘤模型,在此基础上观察应用 PI-88 后肿瘤体积的变化,强化 CT 观察移植瘤局部血供变化,并且观察瘤组织中 HPSE 和 VEGF 的表达情况,探讨 PI-88 对人食管癌 Matrigel 移植瘤生长及血管新生的作用及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及主要试剂

PI-88 由澳大利亚 Progen 公司惠赠(批号: P88RD0100),人食管鳞癌细胞 TE-13 由河北医科大学第四医院科研中心冻存。BALB/c/nu 裸鼠 4~5 周龄,体重 15~18 g,由中国医学科学院实验动物繁殖场提供(实验动物合格证号:京动准字 017)。Matrigel 购自美国 BD 公司,兔抗人 VEGF 多抗及 HPSE 单抗购自武汉博士德公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物公司。

### 1.2 人食管鳞癌 TE-13 细胞 Matrigel 裸鼠移植瘤模型的构建及 PI-88 治疗

对数生长期的 TE-13 细胞以 0.25% 胰蛋白酶溶液消化, PBS 洗涤两遍。取出  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存的 Matrigel,置  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜后与 TE-13 细胞混合制成单细胞悬液,至注射前均保存在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下。8 只 BALB/c/nu 裸鼠每只左侧腹部皮下接种  $200\text{ }\mu\text{l}$  混合液(约  $4 \times 10^6$  个细胞),随机分为治疗组和对照组。治疗组按照  $20\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  剂量皮下注射 PI-88 (PI-88 过滤除菌后配成  $1\text{ mg}/\text{ml}$  无菌生理盐水溶液),对照组

按照同等单位体积( $20\text{ ml}/\text{kg}$ )注射无菌生理盐水 1 次/d,连续治疗 14 d。

### 1.3 肿瘤测量及肿瘤组织血管化程度评估

每日观察裸鼠生长状况,每周 2 次(第 2、6、10、14 天)游标卡尺测量肿瘤的最大直径(a)和最小直径(b),计算肿瘤体积( $V = ab^2/2$ ),第 15 天颈静脉插管注入造影剂,增强 CT 扫描观察肿瘤区域显影情况,记录各组反映肿瘤组织密度的 CT 值,每次测量均重复 5 次。

脱颈椎处死裸鼠,剥离肿瘤,用多聚甲醛固定后采用 S-P 染色法对 HPSE 及 VEGF 进行免疫组化染色,以细胞中出现棕黄色颗粒为阳性显色。200 倍光镜下随机取 5 个视野计数阳性细胞数,列入分析。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件,各组测量值统计前经正态性检验,CT 值及免疫组化数据符合正态分布,组间比较使用  $t$  检验;移植瘤体积数据不符合正态分布,采用非参数检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PI-88 治疗抑制裸鼠移植瘤的生长

所有接种裸鼠均当天成瘤,治疗组肿瘤生长缓慢(图 1)。治疗第 14 天时,治疗组肿瘤体积显著小于对照组[( $70.25 \pm 6.85$ ) vs ( $143.13 \pm 17.18$ )  $\text{mm}^3$ ,  $Z = 2.309$ ,  $P = 0.029$ ]。

### 2.2 PI-88 治疗抑制裸鼠移植瘤的血管生成

CT 值代表不同组织的密度,在强化 CT(血管内注入造影剂)的情况下,因为血运丰富的地方造影剂会富集,因此组织 CT 强化会更明显,在 CT 影像上组织会显得更亮、CT 值更高。治疗组肿瘤区域 CT 值较对照组明显降低( $15.18 \pm 0.91$  vs  $19.23 \pm 2.03$ ,  $t = 3.643$ ,  $P = 0.020$ ) (图 2),说明对照组裸鼠移植瘤区域的血运更为丰富、血管生成旺盛,更有利于肿瘤生长。

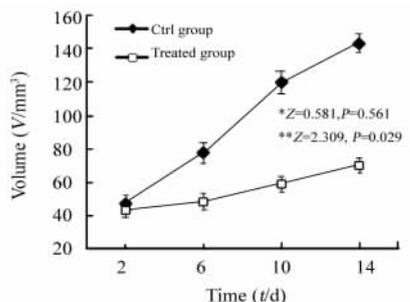


图 1 人食管癌 TE-13 细胞 matrigel 裸鼠移植瘤生长曲线  
**Fig. 1 Growth curves of nude mice xenografts created by coinjection of esophageal squamous tumor cells TE-13 with matrigel**  
 \*  $P < 0.01$  vs treated group

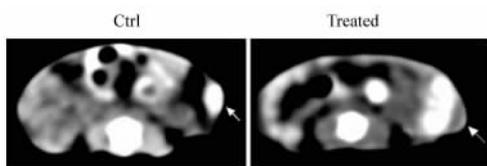


图 2 PI-88 治疗抑制裸鼠移植瘤的血管生成(增强 CT 扫描)  
**Fig. 2 PI-88 treatment inhibited angiogenesis of xenograft in nude mice (Enhanced CT scan)**  
 Arrows points to the xenograft at the left abdomen

肿瘤细胞接近一些黏附分子或促有丝分裂分子。经过不断发展, Matrigel 混合肿瘤细胞或组织接种动物成为一种成熟而有效的建模技术, 而迄今未见有将 Matrigel 用于建立人食管癌裸鼠移植瘤模型报道。HPSE 为人体内唯一特异性降解细胞外基质中硫酸肝素多糖的内糖苷酶<sup>[10]</sup>, 在多种肿瘤组织中高表达, 且在肿瘤的演进、侵袭和转移过程中起重要作用<sup>[11-14]</sup>。随着细胞外基质中硫酸肝素多糖成分的降解, 结合在其上的多种促血管生成因子如 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子( basic fibroblast growth factor, bFGF )等也被释放。VEGF 是目前为止作用最强的一种促血管生成因子, 在多种肿瘤中可发现其过度表达<sup>[15-16]</sup>。以上胞外基质的降解和促血管因子的释放均是肿瘤侵袭和转移过程中的重要步骤, 因此针对 HPSE 的靶向药物逐渐成为热点<sup>[17]</sup>。

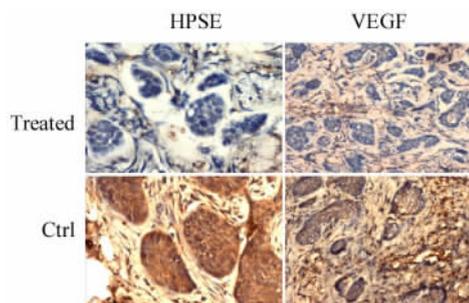


图 3 PI-88 治疗下调移植瘤中 HPSE、VEGF 的表达( S-P 法, ×400 )

**Fig. 3 PI-88 treatment down-regulated the expression of HPSE and VEGF( S-P straining, ×400 )**

2.3 PI-88 抑制裸鼠移植瘤 HPSE 及 VEGF 的表达  
 显微镜观察结果(图 3)显示, 肿瘤细胞异形明显, 核大深染, 呈团巢状排列, 周围散在分布 Matrigel 细胞成分, 类似间质细胞样环绕癌巢分布。HPSE 染色主要定位于肿瘤细胞胞质和胞膜, 处于癌巢外围的肿瘤细胞染色明显, 癌巢周围“间质细胞”中可见少量染色。VEGF 阳性颗粒主要分布于肿瘤细胞胞质, 但癌巢周围间质细胞染色明显, 其中可见微管腔样结构分布, 管腔染色较为明显。

治疗组 HPSE 和 VEGF 阳性细胞数均明显低于对照组[ HPSE:(  $28.70 \pm 6.39$  ) vs (  $87.55 \pm 22.03$  ) 个,  $t = 11.472$ ,  $P < 0.01$ ; VEGF:(  $47.10 \pm 8.18$  ) vs (  $94.40 \pm 14.47$  ) 个,  $t = 12.727$ ,  $P < 0.01$  ]。

### 3 讨论

Matrigel 是从小鼠 Englebreth-Holm-Swanm 瘤中提取出来的细胞外基质成分<sup>[8]</sup>。Fridman 等<sup>[9]</sup>发现, 将小细胞肺癌细胞与 Matrigel 混合注射入裸鼠皮下可形成肿瘤生长, 然而在缺乏 Matrigel 情况下则不能形成肿瘤。Matrigel 在肿瘤细胞外可形成一个保护屏障, 或提供一个自然的结构或立体空间, 使

本研究通过 Matrigel 混合细胞悬液建立了食管癌移植瘤模型, 改进了以往食管癌肿瘤细胞悬液接种裸鼠的建模方式。发现 TE-13 细胞在混合了 Matrigel 的移植瘤中呈团巢状分布, 说明 Matrigel 的三维结构为肿瘤细胞的生长提供了立体空间, 这一特点与文献<sup>[18]</sup>报道的结果相类似。另外, 研究中发现, Matrigel 成分构成了癌细胞周围的基质, 且 HPSE 在癌巢外围染色较中心明显, 提示癌巢在扩张外侵过程中, 直接与胞外基质接触的癌细胞可能会产生更多 HPSE, 以起到降解周围基质成分的作用。再次, 切片染色发现移植瘤基质成分中存在管腔状结构, 其 VEGF 免疫组化染色呈强阳性表达, 考虑 Matrigel 移植瘤刺激裸鼠皮下的微血管长入, 为肿瘤细胞生长提供营养, 从而也为 PI-88 等小分子化合物进入移植瘤内部发挥作用提供了可能。Fridman 等<sup>[19]</sup>将前列腺癌细胞混合 Matrigel 接种联合免

疫缺陷(SCID)小鼠皮下,9 d后同样发现移植瘤内有新生血管长入。Raman等<sup>[20]</sup>研究发现,使用牛肺血管内皮细胞与 Matrigel 混合培养,细胞可在其中自发围成管腔样结构,提示细胞在 Matrigel 内不仅可以存活,而且保存了其生理功能和活动特性。

本研究结果进一步显示,经过 PI-88 治疗后,肿瘤的体积明显缩小。增强 CT 观察发现,使用 PI-88 治疗后的瘤体血供较对照有明显下降,移植瘤中 HPSE 和 VEGF 在 PI-88 治疗组均有明显减少,表明 PI-88 抑制了肿瘤细胞中 HPSE 和 VEGF 蛋白的表达。与之类似,唐维强等<sup>[21]</sup>发现,PI-88 可抑制体外培养的视网膜色素上皮细胞增生,降低细胞内 HPSE 表达,且存在剂量和时间依赖关系。Hu等<sup>[22]</sup>研究证实 PI-88 可抑制人视网膜微血管内皮细胞中 VEGF 表达,降低 HPSE 活性。Liang等<sup>[23]</sup>研究发现 PI-88 能明显抑制氧诱导视网膜小鼠模型的血管生成,降低其 VEGF 和 HPSE 蛋白表达。因此,PI-88 有可能通过抑制食管癌细胞的 HPSE 和 VEGF 表达,降低了肿瘤内的血管新生,从而抑制裸鼠皮下移植瘤的生长。因此,PI-88 有望成为一种新的食管癌靶向药物,值得进一步研究。

## 【参考文献】

- [1] Ferro V, Li C, Fewings K, et al. Determination of the composition of the oligosaccharide phosphate fraction of *Pichia* (*Hansenula*) *holstii* NRRL Y-2448 phosphomannan by capillary electrophoresis and HPLC [J]. *Carbohydr Res*, 2002, 337(2):139-146.
- [2] 肖楚瑶,丁月,蒋建敏. 新型抗肿瘤药 PI-88 及其类似物[J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35(6): 411-414.
- [3] Hudachek SF, Eckhardt SG, Hicks B, et al. Population pharmacokinetic model of PI-88, a heparanase inhibitor [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 65(4): 743-753.
- [4] Lewis KD, Robinson WA, Millward MJ, et al. A phase II study of the heparanase inhibitor PI-88 in patients with advanced melanoma [J]. *Invest New Drugs*, 2008, 26(1): 89-94.
- [5] Khasraw M, Pavlakis N, McCowatt S, et al. Multicentre phase I/II study of PI-88, a heparanase inhibitor in combination with docetaxel in patients with metastatic castrate-resistant prostate cancer [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(6): 1302-1307.
- [6] Wang J, He XD, Yao N, et al. A meta-analysis of adjuvant therapy after potentially curative treatment for hepatocellular carcinoma [J]. *Can J Gastroenterol*, 2013, 27(6): 351-363.
- [7] Liu CJ, Chang J, Lee PH, et al. Adjuvant heparanase inhibitor PI-88 therapy for hepatocellular carcinoma recurrence [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(32):11384-11393.
- [8] Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture [J]. *Proteomics*, 2010, 10(9):1886-1890.
- [9] Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, et al. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(17): 6698-6702.
- [10] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, et al. Mamalian heparanase: Gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis [J]. *Nat Med*, 1999, 5(7): 793-802.
- [11] Leiser Y, Shilo D, Abu El Naaj I, et al. Heparanase, a potential marker for premalignant oral cavity cancer [J]. *In Vivo*, 2014, 28(5): 769-777.
- [12] Wang Q, Shen Y, Wang P, et al. The expression of Heparanase mRNA and its clinical significance in hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer Res Ther*, 2013, 9(2):250-252.
- [13] Chen Y, Chen Y, Huang L, et al. Evaluation of heparanase and matrixmetalloproteinase-9 in patients with cutaneous malignant melanoma [J]. *J Dermatol*, 2012, 39(4):339-343.
- [14] Gawthorpe S, Brown JE, Arif M, et al. Heparanase and COX-2 expression as predictors of lymph node metastasis in large, high-grade breast tumors [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(6): 2797-2800.
- [15] Wróbel T, Mazur G, Dzięczenia J, et al. VEGF and bFGF gene polymorphisms in Polish patients with B-CLL [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 456-460.
- [16] 杨扬,赵长林,袁俊波,等. 直肠癌组织 VEGF 和 Ang-2 表达及其与肿瘤血管形成相关性的探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18(19): 1532-1536.
- [17] 张军,崔亚放,张昌卓,等. 乙酰肝素酶靶点药物的抗肿瘤活性研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 19(8): 953-960.
- [18] Benton G, Kleinman HK, George J, et al. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(8): 1751-1757.
- [19] Fridman R, Benton G, Aranoutova I, et al. Increased initiation and growth of tumor cell lines, cancer stem cells and biopsy material in mice using basement membrane matrix protein (Cultrex or Matrigel) co-injection [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(6):1138-1144.
- [20] Raman K, Karuturi R, Swarup VP, et al. Discovery of novel sulfonated small molecules that inhibit vascular tube formation [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(13):4467-4470.
- [21] 唐维强,张岩,李晓艳,等. 乙酰肝素酶抑制剂对体外培养视网膜色素上皮细胞增殖的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2012, 12(8): 1463-1466.
- [22] Hu J, Song X, He YQ, et al. Heparanase and vascular endothelial growth factor expression is increased in hypoxia-induced retinal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(11): 6810-6817.
- [23] Liang XJ, Yuan L, Hu J, et al. Phosphomannopentaose sulfate (PI-88) suppresses angiogenesis by downregulating heparanase and vascular endothelial growth factor in an oxygen-induced retinal neovascularization animal model [J]. *Mol Vis*, 2012, 18:1649-1657.

【收稿日期】 2015-01-06

【修回日期】 2015-02-28

【本文编辑】 黄静怡